BEITRÄGE ZUR OPTIMIERUNG VON PANKREAS-ENZYMTABLETTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
ABDEL-AZIZ FAWZY
aus Kairo/Ägypten

1984

BEITRÄGE ZUR OPTIMIERUNG VON PANKREAS-ENZYMTABLETTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
ABDEL-AZIZ FAWZY
aus Kairo/Ägypten

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1984

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Graf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.-A. Kovar

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit

Die vorliegende Arbeit wurde Anfang Oktober 1980 unter Anleitung von Professor Dr. E. Graf begonnen und im Mai 1984 abgeschlossen.
Für die wertvollen Anregungen und für die Überlassung dieses Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die Unterstützung dieser Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. E. Graf besonders herzlich.
Herrn Professor Dr. A.H. Ghanem möchte ich für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen herzlich danken.
Herrn Dr. R. Scheer gilt mein besonderer Dank für die fruchtbaren Diskussionen.
Den Kollegen des Arbeitskreises danke ich herzlich für ihre freundliche Hilfe bei der Formulierung.
Dem "Deutschen Akademischen Austauschdienst" danke ich sehr für das gewährte Stipendium.

Inhaltsverzeichnis

Seite

Allgemeine Gesichtspunkte und Problemstellung..... 1

Allgemeiner Teil

Kapitel 1: Bewertung von Pankreatin-Pulverpräparaten verschiedener Produzenten..... 5

1.1 Einleitung..... 5

1.2 Beschreibung der Versuche..... 5

1.2.1 Materialien..... 5

1.2.2 Beurteilung des Pankreatin-Pulvers..... 5

1.2.2.1 Teilchengrößenanalyse..... 5

1.2.2.2 Amylase- und Lipase-Aktivität der verschiedenen Siebfraktionen..... 6

1.2.2.3 Partikelgestalt..... 6

1.2.2.4 Feuchtigkeitsgehalt..... 6

1.2.2.5 Schüttdichte..... 6

1.2.2.6 Fließverhalten..... 6

1.2.2.7 Einfluß der Hitze auf die Amylase- und Lipase-Aktivität..... 6

1.2.3 Herstellung der Tabletten..... 7

1.2.4 Beurteilung der Pankreatin-Tabletten..... 7

1.2.4.1 Physikalische Eigenschaften..... 7

1.2.4.2 Einfluß des Preßdruckes auf die Amylase- und Lipase-Aktivität..... 7

1.3 Ergebnisse und Diskussion..... 7

1.3.1 Beurteilung des Pankreatin-Pulvers..... 7

1.3.2 Bewertung von Pankreatin-Tabletten..... 16

Kapitel 2: Filmdragierung..... 20

2.1 Einleitung..... 20

2.2 Beschreibung der Versuche..... 20

2.2.1 Materialien..... 20

2.2.2 Tablettenherstellung..... 21

2.2.3 Einfluß gebräuchlicher Lacklösungsmittel auf die Enzymaktivitäten von Pankreatin-Tabletten..... 21

Seite

2.2.4 Überzüge..... 21
2.2.5 Lackierungsverfahren..... 23
2.2.6 Bestimmung der Zerfallszeit..... 23
2.2.7 Auflösungsgeschwindigkeit..... 23
2.2.8 Enzymstabilität der lackierten Tabletten..... 24
2.3 Ergebnisse und Diskussion..... 24
2.3.1 Einfluß gebräuchlicher Lacklösungsmittel auf die Enzymaktivität..... 24
2.3.2 Zerfallszeit..... 26
2.3.3 Auflösungsgeschwindigkeit..... 27
2.3.4 Enzymstabilität von Pankreatin-Dragees..... 30

Kapitel 3: Antimikrobielle Behandlung von Pankreatin..... 34
3.1 Einleitung..... 34
3.2 Beschreibung der Versuche..... 34
3.2.1 Bestimmung der Lipase-Aktivität..... 34
3.2.2.1 Methoden der Keimzahlbestimmung..... 35
3.2.2.2 Identifizierung von Bakterien..... 35
3.2.2.3 Nachweis von sogenannten Problemkeimen..... 35
3.2.3 Feuchtigkeitsgehalt..... 35
3.2.4 Methoden der Keimzahlverminderung..... 36
3.2.4.1 Gammastrahlen..... 36
3.2.4.2 Isopropanol-Behandlung..... 36
3.2.4.3 Isopropanol in Kombination mit Gammastrahlen..... 36
3.2.4.4 Ethylenoxid..... 36
3.2.4.5 Keimzahlverminderung durch die Preßkraft beim Tablettiervorgang..... 37
3.2.5 Enzymstabilität der behandelten und unbehandelten Pankreatin-Proben bei einer Lagerung bei 37°C.... 37
3.3 Ergebnisse und Diskussion..... 37
3.3.1 Mikrobiologische Untersuchungen..... 37
3.3.2 Gammabestrahlung..... 37
3.3.3 Isopropanol allein und in Kombination mit Gamma-Strahlen..... 42
3.3.4 Ethylenoxid..... 43

Seite

3.3.5 Verminderung der Keimzahl von Pankreatin allein durch die Preßkraft beim Tablettiervorgang..... 46
3.3.6 Einfluß von mikrobieller Kontamination und verschiedenen Entkeimungsmethoden auf die Lipase-Aktivität bei Lagerung..... 49

Kapitel 4: Der Einfluß der Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin auf die Lipaseaktivierung und Tabletteneigenschaften..... 51
4.1 Einleitung..... 51
4.2 Beschreibung der Versuche..... 52
4.2.1 Materialien..... 52
4.2.2 Lipase-Bestimmung..... 52
4.2.3 Bestimmungsmethoden des Einflusses von Gallensalzen auf die Lipase-Aktivität..... 52
4.2.4 Bestimmung der Lipase-Adsorption an Öl-Wasser-Oberflächen..... 53
4.2.5 Messung der Diffusion von Ölsäure an Öl-Wasser-Grenzfläche..... 53
4.2.6 Bestimmung der kinetischen Parameter der Lipase-Reaktion..... 53
4.2.7.1 Auswahl der Tablettierrezeptur und Herstellung der Tabletten..... 54
4.2.7.2 Physikalische Eigenschaften..... 54
4.3 Ergebnisse und Diskussion..... 55
4.3.1 Einfluß von Gallensalzen auf die Lipase-Aktivität 55
4.3.2 Lipase-Adsorption an der Grenzfläche..... 60
4.3.3 Diffusion der Ölsäure aus Öl-Wasser-Grenzflächen 62
4.3.4 Kinetische Studien..... 64
4.3.5 Einfluß der Gallensalze auf die physikalischen Eigenschaften von Pankreatin-Tabletten..... 68

Kapitel 5: Der Einfluß von Gallensalzen auf Freigabe und Haltbarkeit von Pankreatin-Tabletten..... 71
5.1 Einleitung..... 71
5.2 Beschreibung der Versuche..... 71
5.2.1 Materialien..... 71

Seite

5.2.2 Herstellung der Tabletten..... 71
5.2.3 Stabilität der Lipase in Lösung..... 71
5.2.4 Auflösungsgeschwindigkeit..... 72
5.2.4.1 Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin-Tabletten..... 72
5.2.4.2 Gallensalze in der Prüfflüssigkeit..... 72
5.2.4.3 Die Gleichgewichtslöslichkeit..... 72
5.2.4.4 Die Micellar-Interaktion durch die Molekülsiebmethode..... 72
5.2.5 Stabilitätsstudie..... 73
5.3 Ergebnisse und Diskussion..... 74
5.3.1 Stabilität der Lipase in Lösung..... 74
5.3.2 Auflösungsgeschwindigkeit..... 74
5.3.3 Stabilität..... 82
5.3.3.1 Effekt der Kompression..... 82
5.3.3.2 Enzymstabilität nach Lagerung bei 37°C..... 82
5.3.3.3 Kinetische Studie..... 86

Experimenteller Teil

1 Bestimmung der Pankreasenzyme..... 88
1.1 Amylasebestimmung..... 88
1.2 Lipasebestimmung..... 91
1.2.1 F.I.P.-Methode..... 91
1.2.2 Nephelometrische Methode..... 94

2 Herstellung der Tabletten..... 96

3 Prüfung der physikalischen Eigenschaften der Tabletten..... 97

4 Methoden der Keimzahlbestimmung und Identifizierung von Problemkeimen..... 98

5 Lagerungstest..... 99

Zusammenfassung..... 100

Literaturverzeichnis..... 102

Verwendete Abkürzungen und Handelsnamen..... 108

Allgemeine Gesichtspunkte und Problemstellung

Die Enzymtherapie hat sich insbesondere bei Krankheitsprozessen bewährt, bei denen man die Enzyme unmittelbar an ihre Substrate heranführen kann; also z.B. bei Verdauungsstörungen im Magen-Darm-Trakt, wobei in erster Linie die Pankrease-Enzyme in Frage kommen (1). Diese Enzyme sind in der Regel soweit stabil, daß sie bei sinnvoller Applikation nur langsam zerstört werden und ihnen für die Entfaltung ihrer Wirkung genügend Zeit bleibt.

Alle an der Verdauung beteiligten Enzyme gehören zur Klasse der Hydrolasen, wobei uns insbesondere interessieren:

- Amylasen, welche Glykosidbindungen spalten,
- Proteasen, die Peptidbindungen zerlegen, und
- Lipasen, welche die Esterbindungen langkettiger Fettsäuren lösen.

Verdauungsstörungen

Funktionelle Störungen lassen sich in den meisten Fällen auf Organerkrankungen zurückführen, die im Magen, Dünn- oder Dickdarm sowie in Leber, Galle oder Pankreas vorkommen. Sie haben meist zur Folge, daß die Resorptionskapazität auf Grund unzureichender Verdauung oder Schädigung der Schleimhäute vermindert ist. Hierbei spielen auch die Schäden durch Arzneimittel eine bedeutende Rolle. Eine Vielzahl alter Menschen leidet aber unter funktionellen Störungen ohne organischen Befund. Hier spielt meist die Psyche eine Hauptrolle.

Ein weiterer Störfaktor sind die heutigen Eß- und Lebensgewohnheiten und der allgemeine Streß, die die Zahl von Patienten mit Verdauungsstörungen ständig steigen lassen. Die hohe Zahl von Patienten mit Verdauungsinsuffizienz einerseits und die praktische Unmöglichkeit, diese Störungsbilder allein mit diätetischen Maßnahmen erfolgreich zu behandeln andererseits, hat in der Vergangenheit zur Entwicklung zahlreicher Präparate geführt, die unterschiedliche Verdauungsenzymgemische enthalten.

Substitutionstherapie mit Pankreasenzym

Die Pankreassubstitutionspräparate können erfolgreich Verdauungsstörungen beeinflussen, die auf Mangel oder Fehlen der Verdauungsenzyme des exokrinen Pankreas zurückgehen. Ihr Hauptbestandteil ist das Pankreatin, ein aus frischen Bauchspeicheldrüsen von Rindern und Schweinen gewonnenes Enzymgemisch mit amylotischer, lipatischer und proteolytischer Wirksamkeit. Die Lipase wird hierbei allgemein als das wichtigste Ferment angesehen, weil die Fettverdauung viel anfälliger für Störungen und Pankreasinsuffizienz ist und am empfindlichsten getroffen wird. Demzufolge ist der Gehalt an wirksamen Lipasen ein erstes wesentliches Kriterium für die Brauchbarkeit bzw. Beurteilung eines Enzympräparates.

Problemstellung

Eine wirksame und ökonomische Substitutionstherapie beruht in erster Linie auf einem hochwertigen Pankreatin, bei dem die Aktivität der Verdauungsenzyme in bedeutendem Maße von einem schonenden technologischen Herstellungsverfahren abhängig ist. Während es nun verhältnismäßig einfach ist, ein Magenfermentpräparat zu entwickeln, ist zur wirksamen Substitution mit Pankreas-Fermenten eine Reihe technologischer Schwierigkeiten zu überwinden. Dies geht deutlich aus verschiedenen Veröffentlichungen hervor (2-8), in denen immer wieder zum Ausdruck kommt, daß die benötigten Enzyme aus den meisten Handelspräparaten nicht in genügender Menge, vor allem aber nicht zum geeigneten Zeitpunkt freigesetzt werden. Nada untersuchte in seiner Dissertation 1983 (9) den Einfluß der Herstellungsweise, der verschiedenen Hilfsstoffe und der Lagertemperatur auf die Enzymaktivität.
Die meisten heute verwendeten Pankreatinpräparate sind mit einem säurefesten Schutzmantel umgeben. Im Organismus birgt aber ein magensäureresistenter Schutzmantel wegen seiner häufig nur langsam erfolgenden Auflösung die Gefahr in sich, daß die

wirksamen Substanzen nicht mehr rechtzeitig dort freigesetzt werden, wo Digestion und Resorption vor sich gehen (10). Oft erfolgt die Freisetzung im unteren Ileum und zum Teil erst im Kolon, so daß die lokalen bakteriellen Vorgänge den Fermentationsprozeß störend beeinflussen und die anatomischen Verhältnisse der Resorption stark reduzieren können (3). In neuen experimentellen Befunden (11) wurde festgestellt, daß die Magensaftresistenz der Grund dafür sein kann. Es gilt demnach, eine allgemein verbreitete Meinung zu überwinden, wenn Pankreatinpräparate ohne säurefesten Schutzfilm eingesetzt werden sollen. Daraus ergibt sich, daß eine Formulierung nicht magensaftresistenter Tabletten mit rascher und vollständiger Wirkstofffreigabe erforderlich und brauchbar zu sein scheint.

Für die Herstellung von Enzympräparaten werden vorwiegend Tierorgane verwendet. Hinzu kommen proteolytische Enzyme pflanzlicher Art sowie diverse Lipasen, Amylasen, Hemizellulasen und Zellulasen, die zum Teil aus Hefen, Fadenpilzen und Bakterien fabrikatorisch gewonnen werden. Damit wird es für die Hersteller dieser Präparate nicht immer einfach, über die Qualität und die Wertigkeit ihrer Rohstoffe ein sicheres Bild zu gewinnen. Andererseits ist erfahrungsgemäß das Rohpankreatin für die pharmazeutische Weiterverarbeitung sehr stark mikrobiell kontaminiert. Das Problem der Verminderung der Keimzahl in Arzneipräparaten, welche thermolabile Wirkstoffe enthalten, ohne wesentlichen Wirkungsverlust, spielt heute in der Arzneifertigung eine bedeutsame Rolle. Dabei stehen gerade Enzympräparate für die perorale Verwendung im Vordergrund des Interesses.

Man sollte sich aber auch dessen bewußt sein, daß die Kombination von verschiedenen Komponenten, die in den meisten Pankreatinpräparaten in beträchtlichem Maße vorhanden sind, die Aktivität, Freigabe und Stabilität beeinflussen können.

In dieser Arbeit wird, mit dem Ziel, die Wirkung von Pankreas-Enzymtabletten zu optimieren, im ersten Teil die Problematik der großen Variabilität des Pankreatins verschiedener Hersteller und die Suche nach einer Formulierung nicht magensaftresistenter Tabletten mit rascher und vollständiger Wirkstofffreigabe behandelt. Im zweiten Teil steht die antimikrobielle Behandlung von Pankreatin im Vordergrund. Im letzten Teil werden neben dem Einfluß der Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin auf die Lipaseaktivierung und Tabletteneigenschaften auch die Effekte auf die Lipasefreigabe und -haltbarkeit untersucht.

Allgemeiner Teil

Kapitel 1 Bewertung von Pankreatin-Pulverpräparaten verschiedener Produzenten

1.1 Einleitung

Weil fast alle Medikamente während einiger Phasen des Herstellungsprozesses als Pulver vorliegen, ist eine zusammenfassende kritische Beurteilung grundlegender Pulvereigenschaften von großem Interesse (12-14). Mit der Untersuchung eines Pulvers sind viele Schwierigkeiten verbunden. Hinzu kommt, daß Pulver biologischen Ursprungs sehr verschieden sind.
Pankreatin ist ein biologisches Produkt, das aus verschiedenen Quellen gewonnen wird, wobei verschiedenartige Herstellungs- und Behandlungsmethoden angewendet werden (15), welche sowohl die Eigenschaften des Pankreatin-Pulvers als auch den Tablettierungsvorgang beeinflussen können.

So ist das Ziel dieses Berichtes, einige Widersprüche in der Pankreatin-Literatur aufzuklären. Nach vorgehenden Untersuchungen aus diesem Labor (16,17) wurden Avicel als Hilfsstoff zur Direkttablettierung und quervernetztes Polyvinylpyrrolidon als Sprengmittel für diese Untersuchungen gewählt.

1.2 Beschreibung der Versuche

1.2.1 Materialien

Pankreatin P_1, P_2, P_3, P_4 (Danimex, Hamburg, Kali-Chemie pharma, Hannover, Nordmark-Werke, Hamburg), Avicel PH 102, Polyplasdone XL

1.2.2 Beurteilung des Pankreatin-Pulvers

1.2.2.1 Teilchengrößenanalyse

Die Teilchengrößenverteilung einer Probe von 100 g wurde durch Siebanalyse in einem Schüttelsieb mit einem Satz nach steigender Maschenweite übereinander angeordneter Prüfsiebe nach 30 Minuten bestimmt.

1.2.2.2 Amylase- und Lipase-Aktivität der verschiedenen Siebfraktionen

Amylase- und Lipase-Aktivität jeder Fraktion des P_1 wurde nephelometrisch mit Hilfe des Coleman 91 Amylase-Lipase-Analysators, wie im experimentellen Teil angegeben, bestimmt.

1.2.2.3 Partikelgestalt

Mikrophotographien jedes Pulvers wurden mit einer Kamera, die an ein Mikroskop (Wild Photomikroskop M 400 mit Photoautomat UPS55, Heerbrugg, Schweiz) gekoppelt war, aufgenommen.

1.2.2.4 Feuchtigkeitsgehalt

Der Feuchtigkeitsgehalt wurde nach Karl Fischer (18) bestimmt.

1.2.2.5. Stampfdichte

Die Stampfdichte wurde mit Hilfe des Stampfvolumeters (Engelmann AG, Apparatebau, Ludwigshafen/Rhein) bestimmt. 30 g des Pulvers wurden im graduierten Meßzylinder des Stampfvolumeters 125 mal gestampft.

1.2.2.6 Fließverhalten

Das Fließverhalten wurde mit Hilfe eines graduierten 100 ml-Meßzylinders (Durchmesser 2,5 cm) bestimmt. Die Zeit des Fließens eines Volumens von 100 ml Pulver durch eine kreisförmige Öffnung mit 2 cm Durchmesser wurde registriert (19).

1.2.2.7 Einfluß der Hitze auf die Amylase- und Lipase-Aktivität

Eine Probe jedes Pulvers wurde in einem gut verschlossenen Glasbehälter 2 Monate lang bei 37°C gelagert. Die Enzymaktivität wurde vor der Lagerung und nach 1 und 2 Monaten bestimmt.

1.2.3 Herstellung der Tabletten

Die folgende Herstellungsvorschrift wurde zur Direkttablettierung des Pankreatins verwandt.

Pankreatin	100 Teile
Avicel	100 Teile
Polyplasdone XL	20 Teile
Magnesiumstearat	2,2 Teile

Unter genau festgelegten Bedingungen wurden Pankreatin-Tabletten mit einem Gewicht von 300 mg und Bruchfestigkeiten von 4 und 16 kp hergestellt.

1.2.4 Beurteilung der Pankreatin-Tabletten

1.2.4.1 Physikalische Eigenschaften

Die Gleichförmigkeit der Gewichte, die Dicke, die Zerfallszeit und der Abrieb wurden, wie im experimentellen Teil angegeben, geprüft.

1.2.4.2 Einfluß des Preßdruckes auf die Amylase- und Lipase-Aktivität

Von Tabletten jeder Pankreatincharge wurden die Amylse- und Lipase-Aktivität bestimmt.

1.3 Ergebnisse und Diskussion

1.3.1 Beurteilung des Pankreatin-Pulvers

1.3.1.1 Teilchengrößenanalyse

Abb.1 zeigt die Teilchengrößenverteilung jeder Probe. Sie unterschieden sich deutlich voneinander in der Partikelgröße. P_1 enthält 15% Teilchen über 2000 mm, P_3 und P_4 zeigen eine enge Teilchengrößenverteilung. Bei der ersteren Probe liegen 50% der Teilchen in einem Größenbereich von 100-150 µm, bei der letzten Probe liegen 42% in einem Bereich von 25-50 µm.

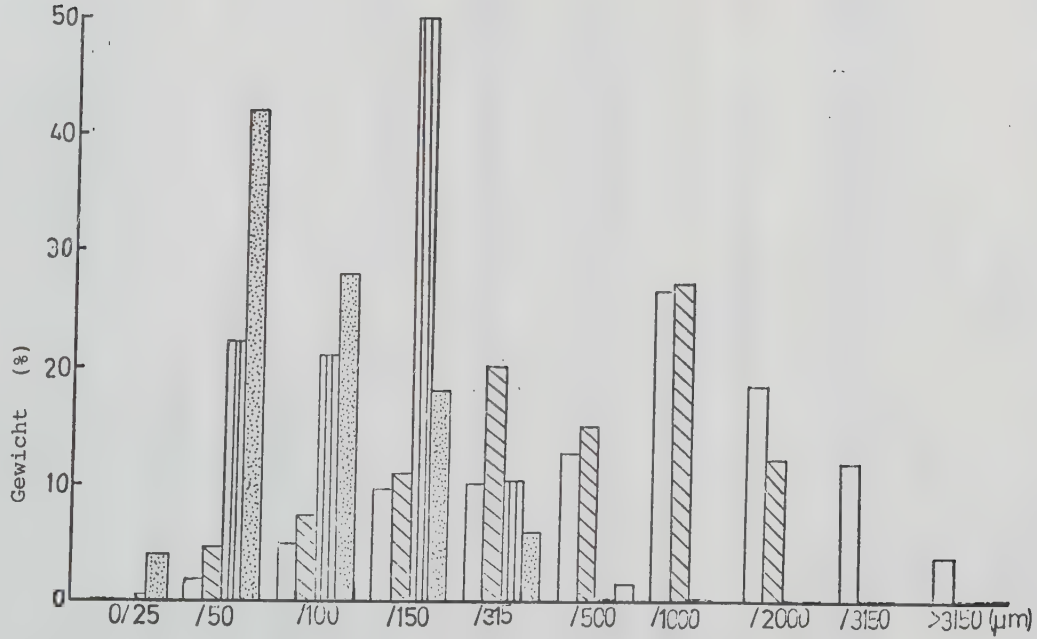

Abb.1 Teilchengrößenverteilung der Pankreatin-Pulver

□ = P_1 ▨ = P_3

▧ = P_2 ⊡ = P_4

Hier ist es wichtig zu erwähnen, daß Pulver mit starker Korngrößenstreuung zur Entmischung neigen, wenn sie während des Tablettierens Vibrationen ausgesetzt werden (20). Weiterhin ist es bekannt, daß die Ungleichförmigkeit des Gewichts einer Tablettencharge durch entweder zu kleine oder zu große Partikel hervorgerufen werden kann (21). P_1 hat einen großen Anteil sehr kleiner Partikel. P_3 und P_4 enthalten sehr große Partikel und bedürfen einer weiteren Teilchengrößenreduzierung. P_3 wurde als das Pulver mit der am besten zum Tablettieren geeigneten Teilchengrößenverteilung betrachtet.

1.3.1.2 Amylase- und Lipase-Aktivität der verschiedenen Siebfraktionen

Die Enzymaktivitäten der Siebfraktion P_1 sind in Abb.2 dargestellt. Aus dem Schaubild geht hervor, daß Partikelgrößen von 25 - 315 µm hohe Enzymaktivitäten aufweisen. Gleichzeitig wurde bei Größen über 315 µm eine signifikante Abnahme der Enzymaktivitäten beobachtet. Die Enzymaktivitäten erreichten ein Minimum in der größten Siebfraktion mit 8% Amylase und 50% Lipase. Es ist bekannt, daß grobe Partikel beim Tablettieren Schwierigkeiten bereiten können (21). Folglich wäre es empfehlenswert, Teilchen von einer Größe über 1000 µm abzutrennen oder weiter zu zerkleinern.

1.3.1.3 Teilchengestalt

Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Abb.3) veranschaulichen die deutlichen Unterschiede bei den Teilchenformen verschiedener Pankreatin-Chargen. Es ist klar zu erkennen, daß die Teilchen von P_1 und P_2 unregelmäßig geformt sind, während die von P_3 sphärisch sind und die von P_4 die Form kleiner Plättchen aufweisen.

Aufgrund der unregelmäßigen Teilchengestalt von P_1 und P_2 ist zu erwarten, daß sich das Pulver gut verpressen läßt und folglich eine relativ geringe Preßkraft beim Tablettieren erforderlich ist (22).

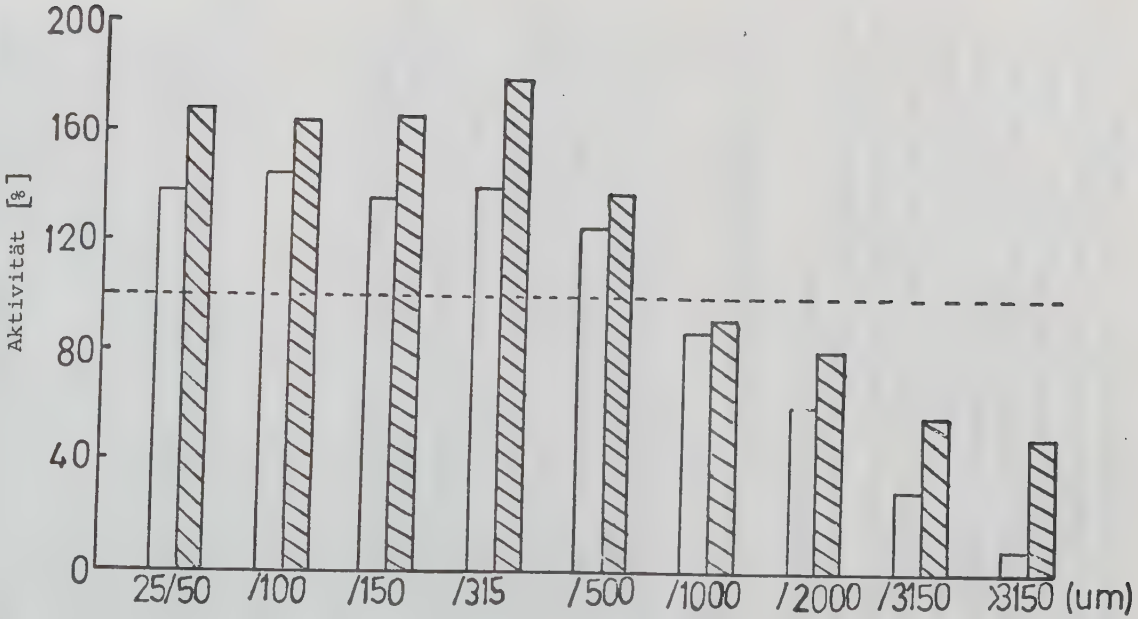

Abb.2: Amylase- und Lipase-Aktivität der verschiedenen Sieb-Fraktionen des P_1

□ = Amylase; ▨ = Lipase

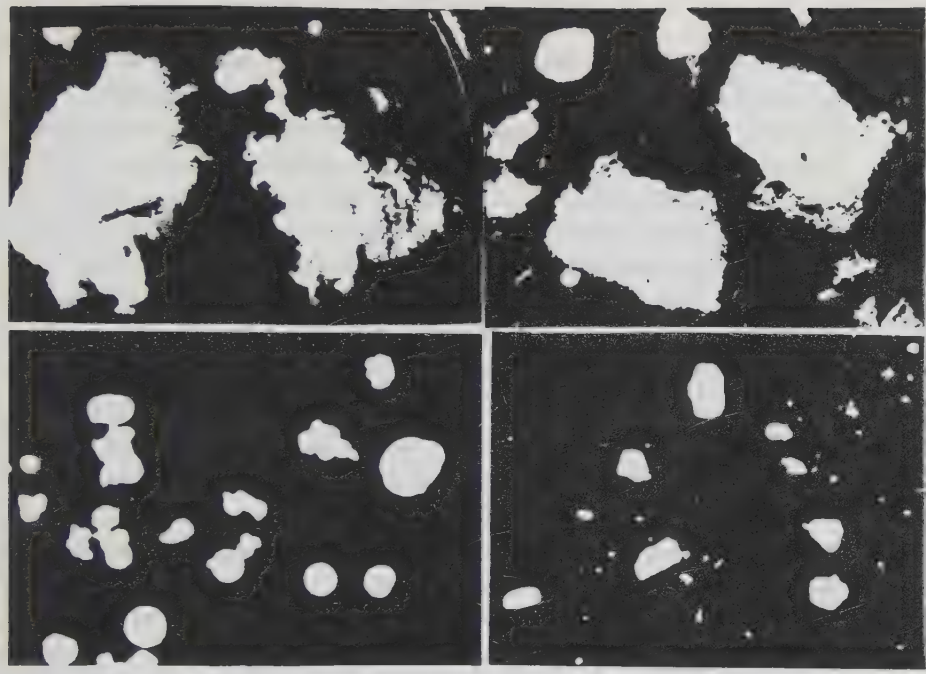

Abb.3: Mikrophotographien von 4 Pankreatin-Pulvern.
oben: links P_1 (x 15), rechts P_2 (x 15)
unten: links P_3 (x 15), rechts P_4 (x 30)

Andererseits könnte die Fließfähigkeit des Pulvers beeinträchtigt werden. Aufgrund der sphärischen Form von P_3 könnte man damit rechnen, daß sich die Fließgeschwindigkeit erhöht (23).
Im allgemeinen beeinflußt die Partikelform die Pulvereigenschaften wie Fließneigungswinkel, Schüttgewicht und Fließgeschwindigkeit (23).

1.3.1.4 Feuchtigkeit

Die Feuchtigkeit der Pulver in Prozenten geht aus Tab.1 hervor. Sie nimmt ab in der Reihenfolge: $P_4 > P_2 > P_1 > P_3$. Außerdem zeigt P_4 einen sehr starken Geruch, während P_3 am schwächsten nach Pankreatin riecht.

Die höhere Feuchtigkeit von P_4 ist möglicherweise für den schlechten Geruch verantwortlich. Obwohl die gefundenen Feuchtigkeitsgehalte niedrig sind, scheinen sie als Maß für die Enzymstabilität von Bedeutung zu sein, was später noch diskutiert wird. Weiter muß erwähnt werden, daß Feuchtigkeit zu einer Verschlechterung der Fließeigenschaften führt aufgrund der zunehmenden Kohäsionskräfte zwischen den Pulverpartikeln (24). Trotzdem sollte daran gedacht werden, daß unter ganz bestimmten Bedingungen Feuchtigkeit die Fließfähigkeit von Pulvern verbessert, indem sie elektrostatische Aufladungen zwischen den Teilchen reduziert und die Entmischung der Pulverkomponenten verzögert (12).

Außerdem ist Feuchtigkeit offensichtlich ein wichtiger Faktor beim Verdichten der Tablettiermasse, und es wurde empfohlen, Pulver nicht irgendeiner Behandlung zu unterziehen, die zu einem übermäßigen Feuchtigkeitsverlust führt (25).

1.3.1.5 Schüttgewicht

Aus Tab.1 geht hervor, daß P_1, P_2 und P_3 vergleichbare Schüttgewichte aufweisen, während P_4 annähernd den doppelten Wert hat. Das Schüttgewicht ist ein Maß für die Komprimierbarkeit des Pulvers und ist eine Funktion der Korngrößenverteilung und der Partikelform (23). P_1 und P_2 bestehen aus unregelmäßig geformten und großen Teilchen, die in der Lage sind, große Hohlräume zu bilden und folglich das Schüttgewicht vermindern können. Das geringere Schüttgewicht von P_3 ist möglicherweise auf die sphärische Form seiner Teilchen zurückzuführen. Andererseits läßt sich vermuten, daß die kleinen Plättchen von P_4 eine dichte Packung bilden, sie sich in dem größeren Schüttgewicht wiederspiegelt.

1.3.1.6 Fließverhalten

Die Ergebnisse aus Tab.1 zeigen, daß P_1 und P_2 eine kreisförmige Öffnung von 2 cm Durchmesser nicht passieren. Diese Tatsache könnte auf das breite Korngrößenspektrum und die unregelmäßige

Partikelform zurückgeführt werden. Gleichzeitig zeigten P_3 und P_4 ein ungestörtes Fließverhalten. P_3 fließt mit größerer Geschwindigkeit als P_3, obwohl sein Schüttgewicht nur ungefähr halb so groß ist wie das von P. Diese Befunde stimmten nicht mit denen von Jones überein (26). Der Autor vertrat die Ansicht, daß die Fließgeschwindigkeit umso größer ist, je größer das Schüttgewicht des Pulvers ist, da die Durchflußmenge mit der Packungsdichte ansteigt.

Fell (29) berichtete, daß die Änderung des Fließverhaltens nicht mit dem Schüttgewicht zusammenhängt. Der Autor ging von der Vermutung aus, daß man sich ein fließendes Pulver im Normalfall so vorstellen müsse: Die Teilchen bewegen sich nach unten und nach innen, durch ihre Bewegungsrichtung bilden sie einen Bogen oberhalb der Öffnung. Die Fließgeschwindigkeit hängt davon ab, wie stabil dieser Bogen ist, der durch den freien Fall der Teilchen entsteht, und wie schnell die Teilchen in diese Zone gelangen. So sind die sphärischen Teilchen von P_3 eher in der Lage, übereinander wegzurollen, und sie sind wahrscheinlich in ihren Fließeigenschaften überlegen. Andererseits verhaken sich die eckigen Partikel von P_4 ineinander und erreichen vermutlich langsamer die Öffnung. Zusätzlich könnte die höhere Feuchtigkeit von P_4 die Fließfähigkeit vermindern (28).

Tab.1: Feuchtigkeitsgehalt, Schüttdichte und Fließverhalten von 4 Pankreatin-Pulvern

	Feuchtigkeitsgehalt (%)	Schüttdichte (g/ml)	Fließverhalten (ml/sec)
P_1	0,30	0,31	unfließbar
P_2	0,44	0,37	unfließbar
P_3	0,28	0,35	100
P_4	0,36	0,73	67

Tab.2: Physikalische Eigenschaften der hergestellten Pankreatin-Avicel-Tabletten aus den verschiedenen Pankreatin-Chargen

	Gewicht (mg)		Dicke (mm)		Zerfallszeit (min)		Abrieb (%)	
	M	%V.K.	M	%V.K.	M.	%V.K.	M.	%V.K.
P_1	307	7,8	3,6	0,8	11,7	38	0,52	20
P_2	294	1,0	3,3	0,3	4,2	22	0,43	2
P_3	294	0,3	3,5	0,2	7,0	13	0,28	3
P_4	299	0,4	3,2	0,3	2,3	12	0,37	10

1.3.1.7 Einfluß von Hitze auf die Amylase- und Lipase-Aktivitäten

Abb.4 zeigt den Verlust an Enzymen in % nach 1- und 2-monatiger Lagerung bei 37°C. Es ist augenscheinlich, daß die Amylase-Aktivität von P_2, P_3 und P_4 stabil bleibt während des ersten Monats und im zweiten Monat einen geringen Verlust zwischen 3 und 7% aufweist. Gleichzeitig war der Verlust an Lipase höher und belief sich auf 15-25% nach einem Monat bzw. auf 31-39% nach zwei Monaten. Der höhere Aktivitätsverlust von P_2 und P_4 könnte auf seinen Feuchtigkeitsgehalt zurückzuführen sein (Tab.1). Andererseits verhielt sich P_1 ganz anders. Hier war die Lipase stabiler als die Amylase. Der Lipaseverlust betrug 5% und 14% und der Amylaseverlust 25% und 47% nach einen bzw. nach zwei Monaten. In einer früheren Veröffentlichung aus diesem Labor (29) wurde Pankreatin einer Hitzebelastung bei verschiedenen Temperaturen ausgesetzt, als indirekte Methode zur Untersuchung des Effektes der Temperaturerhöhung während der Kompression. Dabei wurde gefunden, daß die Lipase stabiler war als die Amylase. In ähnlicher Weise zeigte in unserer Untersuchung P_1 das gleiche Verhalten gegenüber Hitzeeinwirkung auf die Enzymaktivitäten, wie schon früher berichtet wurde (29).

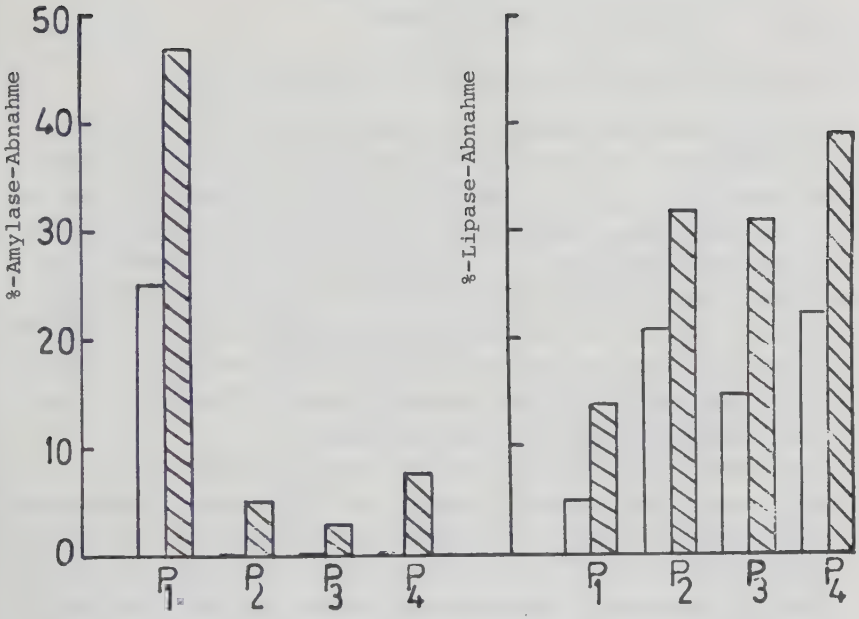

Abb.4: Einfluß von Hitze auf die Amylase- und Lipase-Aktivitäten von 4-Pankreatin-Pulvern

□ = nach 1 Monat bei 37°C;

▨ = nach 2 Monaten bei 37°C.

Eine Überraschung war es, daß P_2, P_3 und P_4 gegenüber P_1 ein gegensätzliches Verhalten zeigten. Bei diesen war die Amylase stabiler als die Lipase. Diese Resultate sind sehr bedeutsam, da sie demonstrieren, daß das Pankreatin verschiedener Hersteller ebenso wie verschiedene Chargen desselben Lieferanten sich gegenüber Hitzeeinwirkung unterschiedlich verhalten können.

1.3.2 Bewertung von Pankreatin-Tabletten

1.3.2.1 Physikalische Eigenschaften

1.3.2.1.1 Gleichförmigkeit von Gewicht und Größe

Das Gewicht und die Größe von 20 Tabletten wurden bestimmt. Der Mittelwert und der Variationskoeffizient werden in Tab.2 wiedergegeben. P_1 zeigte den höchsten Variationskoeffizienten, der die zulässige Standardabweichung für die Gleichförmigkeit des Tablettengewichtes bei weitem überstieg, wie Pietra und Setnikar (30) berichteten. Die Autoren schätzten einen Grenzwert von 2,5% für den Variationskoeffizienten der Gleichförmigkeit des Gewichts. Dieser Unterschied könnte an seiner geringeren Packungsdichte, seinem breiten Korngrößenspektrum und an seiner unregelmäßigen Teilchenform liegen.
Andererseits überstieg der Variationskoeffizient von P_2, P_3 und P_4 nicht den genannten Prozentsatz (30). Diese Zubereitungen ergeben Tabletten mit überlegener Gleichförmigkeit. Der Variationskoeffizient für das Tablettengewicht wurde mit Erfolg dazu verwendet, die Fließfähigkeit von Pulvern bei der Kompression auszudrücken (17,31,32).

1.3.2.1.2 Zerfallszeit

Mit dem Apparat der USP XVIII zur Bestimmung der Zerfallszeit wurden 6 Tabletten einzeln geprüft und der Mittelwert und der Variationskoeffizient sind in Tab.2 und Abb.5 angegeben. Die Zerfallszeit kann nach abnehmenden Werten in folgender Reihe geordnet werden: $P_1 > P_3 > P_2 > P_4$. Obwohl diese Tabletten unter kontrollierten Bedingungen hergestellt wurden, damit sie eine Bruchfestigkeit von 4 kp aufwiesen, wie in Tab.2 gezeigt wird, war die große Streuung der Werte bei den Zerfallszeiten signifikant. Dies könnte auf unterschiedliche Haft- und Bindungskräfte bei verschiedenen Pankreatin-Chargen zurückzuführen sein.

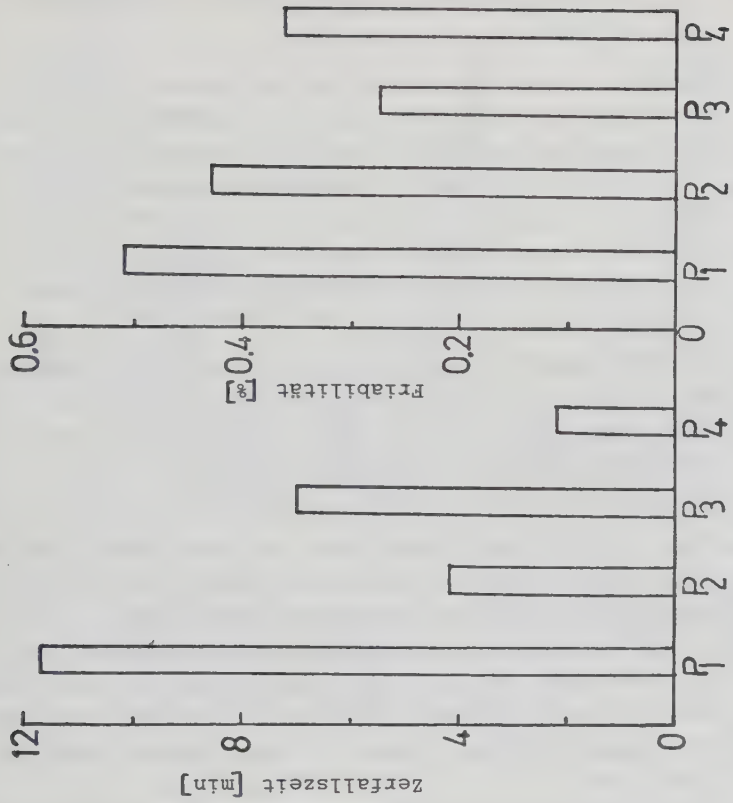

Abb.5: Zerfallszeit und Friabilität (%) der hergestellten Tabletten aus den verschiedenen Pankreatin-Chargen.

1.3.2.1.3 Friabilität

Die Friabilität wurde mit dem Roche Friabilator geprüft. Die Mittelwerte sind in Tab.2 und Abb.5 dargestellt und können nach abnehmenden Werten in folgender Reihe geordnet werden: $P_1 > P_2 > P_4 > P_3$. Die Friabilität könnte die interpartikulare Kohäsion nach dem Verpressen wiedergeben. Von den Partikeln von P_3 könnte man erwarten, daß sie in ihre Zwischenräume die anderen Tablettenbestandteile einlagern, wodurch bessere Tabletten mit überlegenen Eigenschaften hergestellt werden können.

1.3.2.2 Einfluß der Preßkraft auf die Amylase- und Lipase-Aktivitäten

Es ist bekannt, daß die Tablettierung von Enzymen mit einem Aktivitätsverlust verbunden ist. Über das Ausmaß der Verluste beim Tablettieren von Pankreatin wurden widersprüchliche Meinungen vertreten. Graf et al. (29) berichteten darüber, daß der Verlust der Amylase-Aktivität größer ist als der von Lipase. Bei Kompressionsdrücken von 16 KN belief sich der Verlust der Amylase- und Lipase-Aktivitäten auf 5-32% bzw. 5-18%, in Abhängigkeit von der Art der Hilfsstoffe.

Toth et al. (33) wiesen darauf hin, daß Amylase sich gegenüber Preßdruck und Zeit indifferent verhielt. Hüttenrauch und Keiner bestimmten einen Verlust von 12,6% der Amylase-Aktivität, als Pankreatin bei 19,5 KN verpreßt wurde.

Um die Situation zu klären, wurden verschiedene Pankreatin-Chargen bei 2 Preßdrücken tablettiert. Es zeigte sich, daß der Enzymverlust von der Art der Pankreatin-Chargen und dem Preßdruck abhängt, wie in Abb.6 gezeigt wird. Der Verlust an Lipase-Aktivität von P_2, P_3 und P_4 war größer als der von Amylase. Andererseits verhielt sich P_1 ganz anders. Hier war der Verlust der Amylase-Aktivität größer als der der Lipase-Aktivität. Diese Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit dem früheren Bericht aus diesem Labor (29).
Diese Befunde könnten einige widersprüchliche Meinungen in der Literatur erklären.

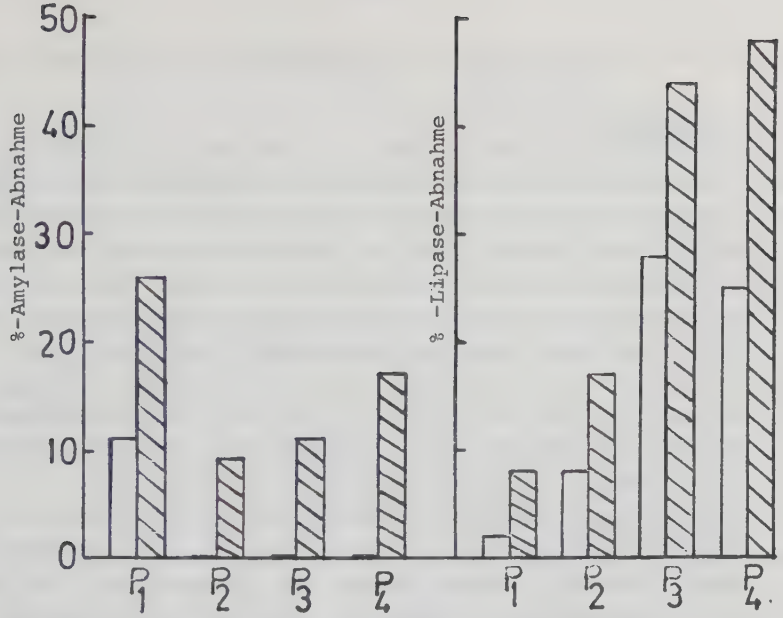

Abb.6: Einfluß der Preßkraft auf die Amylase- und Lipase-Aktivitäten der hergestellten Tabletten aus den verschiedenen Pankreatin-Chargen.

□ = 4 kp; ▨ = 16 kp

Kapitel 2 Filmdragierung von Pankreatin

2.1 Einleitung

Weil das Dragieren von Tabletten die Wirkstofffreigabe beeinflussen kann, sollten Tabletten nur in wirklich begründeten Fällen überzogen werden. Für die Dragierung von Pankreatin-Tabletten gibt es mehrere Gründe (35). Dabei ist die Lackierung mit organisch gelösten Polymeren am besten geeignet, weil die Belastung durch Hitze und Feuchtigkeit entfällt. Doch birgt die Verwendung von organischen Lacklösungsmitteln zahlreiche Probleme und Gefahren, z.B.: Arzneistoff-Wechselwirkung, Lösungsmittelrückstände, Toxizität und Explosionsgefahr. Die Wirkstoffe können auch durch physikalische, vor allem mechanische Beanspruchung während des Dragierens eine Zersetzung erleiden. Es ist Ziel dieser Arbeit, den hemmenden Einfluß von Polymeren und ihren Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität von Pankreatin-Tabletten zu untersuchen, Überzüge zum Verdecken des unangenehmen Pankreatingeruches zu entwickeln, welche eine möglichst geringe Zerfallsverzögerung bewirken; schließlich soll die Enzymfreigabe und -stabilität kurz nach dem Lackieren und nach der Lagerung geprüft werden.

2.2 Beschreibung der Versuche

2.2.1 Materialien

Pankreatin (Kali-Chemie pharma, Hannover), Avicel PH 102, Polyplasdone XL (quervernetztes Polyvinylpyrrolidon = CLPVP), Viscostran 50 (Hydroxypropylmethylcellulose = HPMC), Kollidon 25 (Polyvinylpyrrolidone = PVP), Polyglykol (Polyethylenglykol 10,000), Eudragit E (EE), Eudragit L (EL), Ethylcellulose, Celluloseacetatphthalat (CAP), Dibutylphthalat, Triacetin.

2.2.2 Tablettenherstellung

Die Zusammensetzung ist wie im ersten Kapitel beschrieben. Avicel und CLPVP wurden bei 60°C über Nacht getrocknet. Die Tabletten wurden durch Direkttablettierung, wie im experimentellen Teil ausführlich beschrieben, hergestellt. Die angewendete Preßkraft war 2 KN.

2.2.3 Einfluß gebräuchlicher Lacklösungmittel auf die Enzymaktivitäten von Pankreatin-Tabletten

5 Tabletten wurden in einen lose verschlossenen Glasbehälter gelegt und gewogen. Dann wurden sie in Exsikhatoren, die mit 50 ml Methanol, Ethanol, Isopropanol, Aceton, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Ethylacetat resp. Wasser beschickt waren, bei Raumtemperatur 15 Tage gelagert. Die Glasbehälter wurden noch einmal gewogen. Die Lipase- und Amylase-Aktivität der Tabletten wurde vor und nach der Lagerung nephelometrisch, wie im experimentellen Teil angegeben, bestimmt.

2.2.4 Überzüge

2.2.4.1 Nichtmagensaftresistente Überzüge

HPMC, PVP, PEG, EE wurden als Filmbildner gewählt. Mehrere Versuche wurden angestellt, um eine Rezeptur zu entwickeln, welche die besten Überzüge liefert. Die ausgewählten Rezepturen sind in Tab.3 aufgeführt.

2.2.4.2 Magensaftresistente Überzüge

CAP und EL wurden als magensaftresistente Filmbildner verwendet.
Tab.3 zeigt die ausgewählten Rezepuren, die zu brauchbaren Überzügen führen.

Tab.3: Überzüge-Rezepturen für Pankreatin-Avicel-Tabletten (gm)

Materialien	Nichtmagensaftresistente							Magensaftresistente	
	HPMC		PEG		PVP		EE	CAP	EL
	A	B	A	B	A	B	12%		12,5%
Polymer	1.0	1.0	4.0	4.0	2.4	2.4	32.0	10.0	40.0
EE	-	1.0	-	1.0	-	1.0	-	-	-
Ethylcellulose	-	-	-	-	0.8	0.8	-	-	-
Dibuthylphthalat	0.5	0.5	-	-	1.6	1.6	-	2.25	2.25
Triacetin	-	-	-	-	-	-	-	0.75	0.75
Isopropanol	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	19.0	28.0	-	17.0
Chloroform	69.5	68.5	61.0	60.0	66.2	65.2	-	-	-
Aceton	-	-	16.0	16.0	10.0	10.0	-	87.0	-
Ethanol 99%	10.0	10.0	-	-	-	-	-	-	-
Pigementsuspension	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	40.0	10.0	40.0

2.2.5 Lackierungsverfahren

Staubfreie Tablettenansätze zu je 100 g wurden in einem Dragierkessel, der mit 4 Baffles und Luftzufuhr ausgestattet ist, mit einem Heidolph-Sprühapparat besprüht. Die Dicke des Überzugs wurde entsprechend einer minimalen Zerfallsverzögerung bei nichtmagensaftresistenten Tabletten bzw. entsprechend der Unlöslichkeit bei magensaftresistenten Tabletten in 0,1N-HCl für 1 Stunde gewählt. Die Tabletten wurden danach 24 Stunden lang mit Umluft bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.6 Bestimmung der Zerfallszeit

a) Nichtmagensaftresistent lackierte Tabletten

Die Zerfallszeit von 6 Tabletten wurde mit dem USP XX Zerfallsprüfgerät unter Verwendung von Scheibchen und demineralisiertem Wasser bestimmt.

b) Magensaftresistente Tabletten

Nach dem Amerikanischen Arzneibuch (USP XX). Als künstlicher Magensaft wurde 0,1N-HCl, zur Herstellung des künstlichen Darmsaftes Phosphatpuffer pH 6,8 verwendet.

2.2.7 Auflösungsgeschwindigkeit

Nach USP XX (Apparatur 2), 500 ml demineralisiertes Wasser für nichtmagensaftresistent lackierte Tabletten und 500 ml Phosphatpuffer pH 6,8 für magensaftresistent lackierte Tabletten, 25°C, 100 u/min. Nach bestimmten Zeiträumen wurden je 15 ml Probe unter Verwendung einer mit einem Stückchen Watte verstopften Glasspritze entnommen, dann durch ein Sinterglasfilter abfiltriert, wie bei der nephelometrischen Methode im experimentellen Teil beschrieben, und für die Aktivitätsbestimmung weiter behandelt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und die Mittelwerte der prozentualen Löslichkeit berechnet.

2.2.8 Enzymstabilität der lackierten Tabletten

2.2.8.1 Einfluß der Dragierverfahren

Lackierte und unlackierte Pankreatin-Tabletten wurden auf Amylase- und Lipase-Aktivität kurz nach dem Lackieren untersucht.

2.2.8.2 Lagerung bei 37°C

Lackierte und unlackierte Pankreatin-Tabletten wurden in einem fest verschlossenen Glasbehälter bei 37°C gelagert. Amylase- und Lipase-Aktivität wurden vor und nach 1, 2 und 3 Monaten Lagerung bestimmt.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Einfluß gebräuchlicher Lacklösungsmittel auf die Enzymaktivitäten

Abb.7 zeigt die %-Verluste der Amylase- und Lipase-Aktivität nach Einwirkung des Lösungsmitteldampfes. Es zeigte sich, daß Lipase empfindlicher gegenüber Lösungsmittel ist als Amylase. Methanol und Dichlormethan verursachten etwa 90% Verlust an Enzymaktivität. Wasserdampf verursachte mehr als 70% Verlust. Deshalb darf der Feuchtigkeitsgehalt eines Enzympräparates bei einer Stabilitätsprüfung nicht übersehen werden.
Wie Abb.7 zeigt, tritt bei Verlängerung der Kohlenwasserstoffkette und bei zunehmender Chlorsubstitution von Methan ein geringerer Verlust an Enzymaktivität auf. Den geringsten Verlust bewirkt Tetrachlorkohlenstoff, der jedoch für die Filmdragierung wegen seiner Toxizität nicht empfohlen werden kann. Geeignet für die Filmdragierung des Pankreatins sind also: Isopropanol, Chloroform und Aceton.

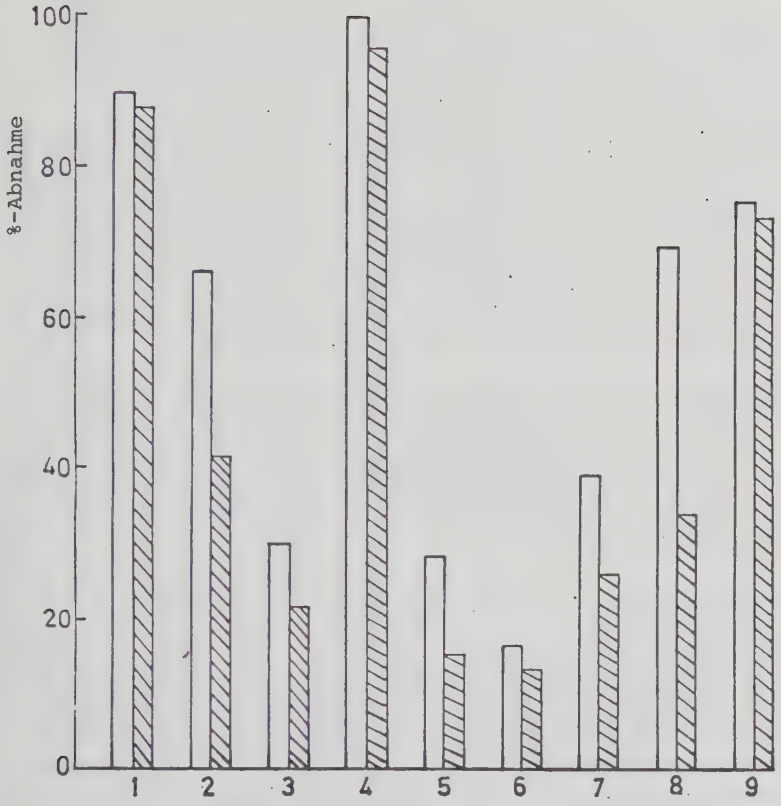

Abb.7: Einfluß gebräuchlicher Lacklösungsmittel auf die Enzymaktivität der Pankreatin-Tabletten.

□ = Lipase; ▨ = Amylase

1 = Methanol; 2 = Ethanol; 3 = Isopropanol; 4 = Dichlormethan; 5 = Chloroform; 6 = Tetrachlorkohlenstoff; 7 = Aceton; 8 = Ethylacetat; 9 = Wasser

Nach Bauer und Vazakas (36) führen 20-80% Ethanol wie auch unverdünnter Alkohol zu einer langsamen Lipaseinaktivierung. Ein ähnliches Verhalten wurde bei der Einwirkung von Methanoldämpfen auf Multivitamin-Tabletten (37) beobachtet, wobei beträchtliche Verluste der Vitamine B_1, B_{12} und Ascorbinsäure auftraten. Andererseits beeinflußten Aceton, n-Butanol, Butylacetat, Isopropanol und Methylenchlorid die Vitaminstabilität nicht. Es ist interessant, daß trotz sorgfältiger Trocknung mit CAP in Aceton lackierte Tabletten Lösungsmittelreste enthalten, die einen unangenehmen Geruch verursachen und die Stabilität der Wirkstoffe beeinflussen können (38).

Die Untersuchung zeigt deutlich, daß Lösungsmittel verschiedene inaktivierende Einflüsse auf Pankreasenzyme ausüben, und da Rückstände von diesem in lackierten Tabletten vorhanden sein können, muß auf die Auswahl geeigneter Lösungsmittelsysteme geachtet werden.

2.3.2 Zerfallszeit

Die Zerfallszeit für lackierte und unlackierte Tabletten sind in Abb.8 graphisch dargestellt. Es folgt, daß beim Lackieren mit HPMC und PEG keine Änderung der Zerfallszeit auftritt. Andererseits verzögert die Lackierung mit anderen Polymeren die Zerfallszeit beträchtlich. PVP-Lack verdoppelt die Zerfallszeit, möglicherweise durch die Anwesenheit von Ethylcellulose bedingt. Ethylcellulose wurde verwendet, um die Klebrigkeit , die mit PVP verbunden ist, zu verhindern (39. 40). Ein Zusatz von 1% EE zu HPMC, PEG und PVP-Lacken verlängert die Zerfallszeit der lackierten Tabletten um 20% bei den beiden ersten Polymeren und um 50% beim letzten Polymeren. Magensaftresistent lackierte Tabletten mit CAP und EL waren in 0,1N-HCl nach einer Stunde noch nicht zerfallen, dann sind sie in Phosphatpuffer pH 6,8 innerhalb von 18 bzw. 20 Minuten zerfallen. Diese Tabletten zeigten keinen Pankreatingeruch. Dagegen spürt man bei nichtmagensaftresistenten Tabletten, die ohne EE überzogen sind, noch einen schwachen Geruch. Jedoch wird die Zerfallszeit durch Verwendung von EE erhöht.

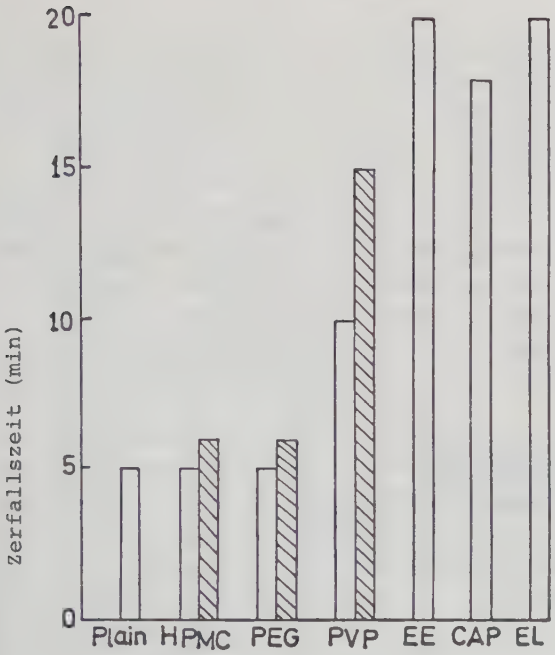

Abb.8: Zerfallszeit der lackierten und unlackierten Pankreatin-Tabletten

□ = Filmbildner

▨ = Filmbildner + 1% EE

Hier soll erwähnt werden, daß bei schnellem Zerfall der Pankreatin-Tabletten ein optimaler Kontakt zwischen den Enzymen und ihrem Substrat erreicht werden kann (41). Überdies ist schneller Zerfall eine wichtige Forderung für die befriedigende Bioverfügbarkeit der Enzyme (42, 43).

2.3.3 Die Auflösungsgeschwindigkeit

Abb.9 zeigt den Einfluß der Filmdragierung auf die Auflösungsgeschwindigkeit der Amylase. Darin wird deutlich, daß HPMC-lackierten Tabletten eine fast so rasche Enzymfreigabe wie unlackierte Tabletten zeigen, wobei mehr als 85% Amylase innerhalb von 10 Minuten freigegeben werden.

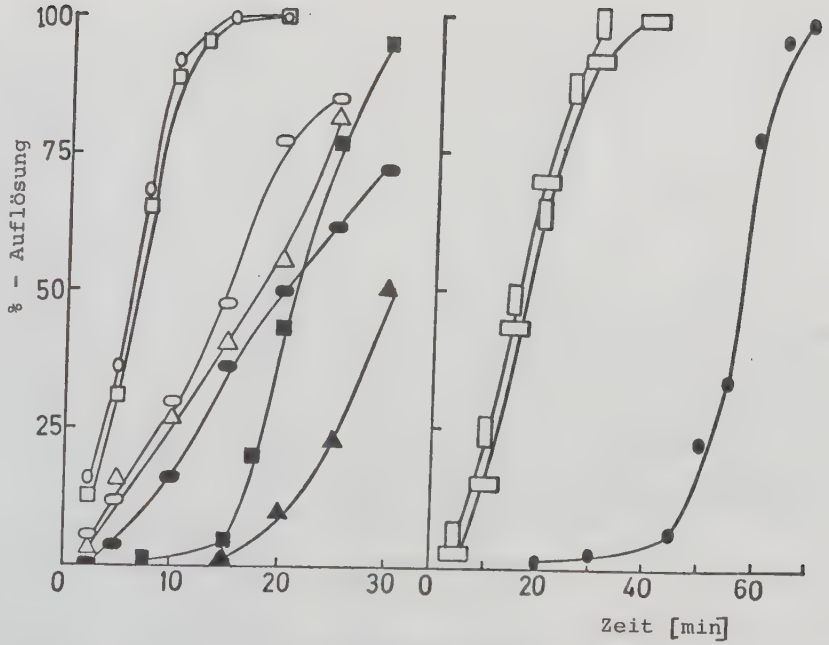

Abb.9: Auflösungsgeschwindigkiet der lackierten und unlackierten Pankreatin-Tabletten.

O = Kontrolle; □ = HPMC; ○ = PEG; △ = PVP; ■ =HPMC+1%EE;
● = PEG+1%EE; ▲ = PVP+1%EE; ▯ = CAP; ▭ = EL; • = EE

Andere Lacke verzögern die Enzymfreigabe beträchtlich. PEG-lackierte Tabletten zeigen eine langsamere Freigabe als HPMC-lackierte Tabletten, obwohl beide die gleiche Zerfallszeit haben. Innerhalb der ersten 10 Minuten ist die Auflösungsgeschwindigkeit von PVP-lackierten Tabletten mit der von PEG-lackierten Tabletten vergleichbar, danach ist sie kleiner. Bei Tabletten, die mit EE lackiert sind, wurde die Freigabe um 30-40 Minuten verzögert, in den folgenden 15 Minuten erfolgte dann schnelle Freigabe. Diese Verzögerung ist möglicherweise eine Folge der Unlöslichkeit von EE in Wasser und der für die Sprengung und das Abschälen der Hülle benötigten Zeit.

Bei Zugabe von 1% EE zu HPMC, PVP und PEG wurde eine Verzögerung von 15 Minuten bei der Enzymfreigabe der HPMC- und PVP-lackierten Tabletten, im Gegensatz zu den PEG-lackierten, beobachtet. Dies kann mit dem höheren Eudragit: Polymer-Verhältnis der beiden ersten erklärt werden. So kann der Zusatz von EE zu den anderen Polymeren den Geruch vermindern mit dem Nachteil einer verzögerten Enzymfreigabe.

CAP- und EL-lackierte Tabletten zeigen eine vergleichbare Freigabe in Phosphatpuffer pH 6,8, wobei die Hauptmenge der Enzyme innerhalb 30 Minuten freigegeben wird (Abb.9).

Vor kurzem verglich Möller (44) die Freigabe einiger Pankreatin-Handelspräparate und fand, daß bei fast allen untersuchten Präparaten keine Enzymfreigabe innerhalb der ersten Stunde nachweisbar war.

Aus der Literatur folgt, daß die Herstellungsbedingungen und die Eigenschaften der Lackschicht, wie Dicke, Härte und Porosität die Auflösung der lackierten Tabletten beeinflussen können (45). Identische Tabletten mit Methylcellulose und HPMC zeigen ein sehr unterschiedliches Freigabeprofil (46) aufgrund der unterschiedlicher Löslichkeit der Polymeren. Weiterhin war die Freigabe des Aspirins aus Tabletten, die mit HPMC überzogen wurden, unter Verwendung eines Lösungsmittels, das Isopropanol enthält, bedeutend langsamer als aus Dichlormethan/Methanol (47). Ferner steuert die Veränderung des Verhältnisses der Filmbildner die Zerfallszeit und die Auflösungsgeschwindigkeit der überzogenen Komprimate (48).

So ist es wichtig, daß die Filmschicht von der Tablette gelöst oder entfernt werden muß, um den Zerfall und die Auflösung nicht zu behindern. Unter diesen Gesichtspunkten stellt HPMC den geeignetsten wasserlöslichen Überzug für Pankreatin-Tabletten dar.

2.3.4 Enzymstabilität von Pankreatin Dragees

2.3.4.1 Einfluß des Dragierungsverfahrens

Die prozentualen Verluste der Amylase- und Lipase-Aktivitäten während des Dragierungsverfahrens werden in Abb.10 dargestellt. Es wird deutlich, daß die Amylase-Aktivität nicht erheblich durch das Überziehen beeinflußt wurde. Dagegen zeigte Lipase einen erheblichen Aktivitätsverlust, der bis zu 5% für nichtmagensaftresistente und bis zu 25% für magensaftresistente Überzüge beträgt. Bei solch empfindlichen biologischen Wirkstoffen wie Pankreatin kann ein Verlust von 5% als normal angesehen werden. Andererseits sind 25% Lipase-Verlust eine völlige Überraschung. Das kann auf die stärkere mechanische Belastung und die längere Einwirkung von Lösungsmitteldämpfen während der Herstellung von magensaftresistenten Überzügen zurückzuführen sein.

Töth et al. (33) berichteten ebenfalls, daß die Amylase-Aktivität durch magensaftresistentes Überziehen nicht beeinflußt wird und der Verlust an der Lipase-Aktivität nicht mehr als 5% betrug. Der Unterschied zwischen ihren und unseren Ergebnissen könnte an den verschiedenen verwendeten Pankreatinchargen (40), Filmbildnern, Lösungsmittelsystemen und Lackierungsbedingungen liegen.

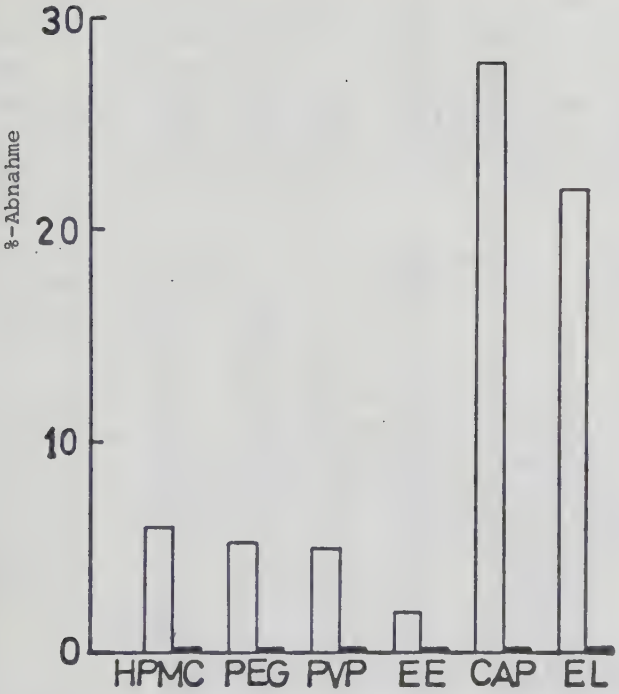

Abb.10: Einfluß des Dragierverfahrens auf die Enzym-Aktivitäten.

□ = Lipase; ■ = Amylase

2.3.4.2 Enzymstabilität nach Lagerung bei 37°C

Abb.11 zeigt die prozentualen Amylase- und Lipase-Verluste beim Lagern bei 37°C. Es zeigt sich, daß Überzüge mit HPMC, EE, CAP und EL einen befriedigenden Schutz für Pankreasenzyme leisten. Dagegen verlieren PEG- und PVP-lackierte Tabletten erhebliche Enzymaktivitäten, verglichen mit unlackierten Tabletten. Man kann die Möglichkeit, daß die verwendeten Lacklösungsmittel die Enzyme zerstören, vernachlässigen durch die geeignete Auswahl von Lacklösungsmitteln.

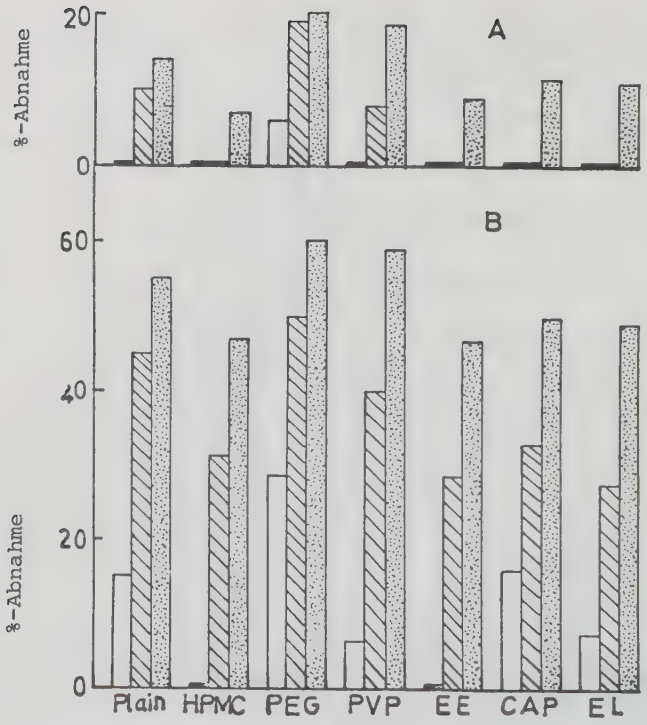

Abb.11: Einfluß der Filmdragierung auf die Enzymstabilität bei der Lagerung bei 37°C.
A = Amylase; B = Lipase
□ = 1 Monat; ▨ = 2 Monate; ⁘ = 3 Monate

Ebenfalls wurde angenommen, daß der Wassergehalt der lackierten Tabletten keinen bedeutenden Einfluß auf die Enzymstabilität hat, da, wie Tab.4 zeigt, die Feuchte fast vergleichbar ist. So bleibt eine Polymer-Pankreatin-Wechselwirkung als der Hauptverursacher für den erheblichen Enzymaktivitätsverlust bei PEG- und PVP-lackierten Tabletten übrig.

PEG kann mit den Pankreatinenzymen eine Wechselwirkung eingehen, wie früher Graf et al. (50) beschrieben haben.
Hier ist es wichtig zu erwähnen, daß die erheblichen Enzymaktivitätsverluste bei PVP- und PEG-lackierten Tabletten nicht gleich nach der Herstellung beobachtet wurden. Das kann als Resultat einer Zeit erfordernden Wechselwirkung erscheinen.

So soll eine Lagerungsuntersuchung von einem umfassenden Urteil über die Eignung eines Filmbildners durchgeführt werden.

Tab.4: Feuchtigkeitsgehalt (%) der trocken lackierten und unlackierten Pankreatin-Avicel-Tabletten

	Feuchtigkeitsgehalt[a)] (%)
-	0,45
HPMC	0,51
PÄG	0,50
PVP	0,49
EE	0,48
CAP	0,47
EL	0,48

a = Mittelwert 3 Bestimmungen mittels Karl-Fischer-Methode

Kapitel 3 Antimikrobielle Behandlung von Pankreatin

3.1 Einleitung

Stoffe natürlichen Ursprungs, also auch Pankreatin, können bekanntlich stark mikrobiell kontaminiert sein; auch pathogene Arten werden häufig gefunden (51). Abgesehen von möglichen gesundheitlichen Risiken, hervorgerufen durch die Mikroorganismen selbst oder durch deren Toxine, können sich die galenischen Eigenschaften, z.B. Lagerstabilität und Freisetzung von Arzneimitteln, die aus derartigen Rohstoffen hergestellt wurden, stark verschlechtern (52, 53, 54). Den neuesten Anforderungen an die Keimverminderung oraler fester Arzneiformen entsprechend wurden verschiedene Versuche mit Pankreatin durchgeführt (55, 56, 57,58). Die Fragen, denen unterdessen größere Bedeutung zukommt, beziehen sich auf die Auswirkung dieser Methoden auf die Enzymaktivität und auf sich daraus ergebende Umweltprobleme. Somit lautet die Forderung für die Praxis der Pankreatinhersteller noch immer, eine antimikrobielle Behandlung ohne wesentlichen Wirkungsverlust, die dazu noch umweltfreundlich ist, zu entwickeln.
Es wird die Wirkung verschiedener antimikrobieller Maßnahmen auf Pankreatinmuster untersucht, ebenso die Reduktion der Gesamtkeimzahl, der Enterobakterien sowie der Einfluß auf die lipolytische Enzymaktivität. Außerdem wird Druckeinwirkung als Möglichkeit zur Reduzierung der Keimzahl von Pankreatin vorgestellt.

3.2 Beschreibung der Versuche

3.2.1 Bestimmung der Lipase-Aktivität

Die Messung wurde nach der FIP-Methode, wie im experimentellen Teil angegeben, durchgeführt.

3.2.2 Mikrobielle Untersuchungen

3.2.2.1 Methoden der Keimzahlbestimmung

3.2.2.1.1 Aerobier

1 g Probe wurde in 10 ml Pepton-Phosphatpuffer homogen verteilt. Mit 0,5 ml dieser Stammsuspension und eventuell weiteren Verdünnungen (1:10) -je nach erwarteter Keimzahl- wurden Spatelplatten auf Caso-Agar (Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Agar; Merck, Art.nr. 5458) angelegt. Die Auswertung erfolgt nach 3tägiger Bebrütung bei 30°C.

3.2.2.1.2 Hefen und Schimmelpilze

Je nach erwarteter Keimzahl wurden 1 bzw. 5 ml der Pankreatinsuspension mit Sabouraud-Agar (Merck, Art.Nr. 7315) durchgemischt und mind. 10 Tage bei Raumtemperatur bebrütet. War in dieser Zeit noch kein Wachstum festzustellen, wurde die Brutzeit um weitere 10 Tage verlängert.

3.2.2.2 Identifizierung von Bakterien

Verschiedene Einzelkolonien wurden nach Gramfärbung morphologisch differenziert.

3.2.2.3 Nachweis von sogenannten Problemkeimen

In Anlehnung an die Methoden der FIP (59) wurden die Pankreatinproben auf Abwesenheit von Enterobakteriaceen, insbesondere E. Coli und Salmonellen, Pseudomonas aeruginosa und Staphylococcus aureus geprüft. Bei positivem Enterobakteriaceenbefund erfolgte Identifizierung mittels Enterotube von Roche II (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz).

3.2.2 Feuchtigkeitsgehalt

Der Feuchtigkeitsgehalt wurde mittels Karl-Fischer-Methode bestimmt.

3.2.4 Methoden der Keimzahlverminderung

3.2.4.1 Gammastrahlen

Pankreatinmuster wurden in sterile Polyäthylenbeutel eingeschweißt und bei Raumtemperatur in folgenden Bestrahlungsanlagen bestrahlt:

a) ^{60}Co Gammazelle (Js 9000 pallet Bestrahler, Atomenergie der Canada Limited, Gammaster, EG Ede, Netherlands) mit einer Dosisleistung von 2,94 kGy/h und Dosen zwischen 0,75 und 5 kGy.

b) ^{60}Co Gammazelle (COP 3, Sulzer in Winterthur, Schweiz, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) mit einer Dosisleistung von 1,1 kGy/h und Dosen von 25 kGy.

c) ^{137}CS Gammazelle (GC, Atomenergie der Canada Limited, Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Immungenetik, Tübingen, BRD) mit einer Dosisleistung von 82,4 Gy/h und Dosen von 1,2 und 2,4 kGy.

3.2.4.2 Isopropanol-Behandlung

Pankreatinmuster wurden mit Isopropanol-Wasser-Mischung (88,2%) 20 Stunden lang bei Raumtemperatur gemäß Lüssi-Schlatter et al. (55) behandelt.

3.2.4.3 Isopropanol in Kombination mit Gammastrahlen

Die behandelten Pankreatinmuster mit Isopropanol gemäß der oben aufgeführten Methode wurden mittels ^{137}CS mit Dosen von 1,2 kGy bei Raumtemperatur bestrahlt.

3.2.4.4 Ethylenoxid

Mehrere Behandlungen wurden unter verschiedenen Bedingungen wie folgt durchgeführt:

	1	2	3	4	5
Aussetzungszeit (S)	12	5	5	64	2
Temperatur (C)	21	22	21	20	22
Gaskonzentration (kg/m^3)	1	0,95	0,85	0,28	0,32

3.2.4.5 Keimzahlverminderung durch die Preßkraft beim Tablettiervorgang

Tabletten wurden durch Direkttablettierung auf einer instrumentierten Korsch-Exzentermaschine hergestellt. Für die Zubereitung wurde eine Überstempelpreßkraft von 5 kN aufgewandet. Die Zubereitung hat die gleiche Zusammensetzung wie im ersten Kapitel. Brikettiert wurde bei 1, 3, 5 und 10 kN.

3.2.5 Enzymstabilität der behandelten und unbehandelten Pankreatin-Proben bei Lagerung bei 37 °C

Behandelte und unbehandelte Pankreatin-Proben wurden in fest verschlossenen Glasbehältern bei 37°C 6 Monate lang gelagert. Die Lipase-Aktivität wurde vor und gleich nach der antimikrobiellen Behandlung sowie in bestimmten Zeitintervallen gemäß der FIP-Methode bestimmt.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Mikrobiologische Untersuchungen

Die Bestimmung der Ausgangskontamination der verschiedenen Pankreatin-Proben ergab folgendes Bild: wie aus Tab.5 zu ersehen, waren P_1 und P_3 wesentlich stärker mit Aerobiern verkeimt als P_2. In P_1 wurden die meisten Hefen und Schimmelpilze gefunden. P_1 und P_2 waren größtenteils mit grampositiven stäbchenförmigen Bakterien, Sporenbildnern und Sporen kontaminiert, während in P_3 hauptsächlich grampositive und gramnegative Kokken und gramnegative Stäbchen, aber sehr wenig Sporenbildner gefunden wurden.
Bei den Untersuchungen auf unzulässige Keime wurde in P_3 Enterobacter agglomerans (100/g) identifiziert.

3.3.2 Gamma-Bestrahlung

Abb.12 zeigt den Lipaseverlust in Prozent der mit ^{60}Co bestrahlten Pankreatinproben bei Dosen zwischen 0,75 und 5 kGy.

Es ist ersichtlich, daß die Lipaseaktivität im Verhältnis zur Dosis abnimmt. Die Lipaseverluste bei P_1 und P_2 sind ähnlich und erreichen 15% bei Dosen bis zu 5 kGy. P_3 zeigt einen höheren Verlust von 23,5% bei derselben Dosis. Die Empfindlichekit der Bakterien von P_3 ist viel höher als die von P_1 und P_2. Die vorher beschriebenen Bakterien der Proben können diese Beobachtung erklären. Es ist bekannt, daß Sporen und Sporenbildner resistenter als vegetative Zellen sind und innerhalb der Bakterien gm (-) empfindlicher als gm (+). Hefen sind resistenter als Pilze. Mitglieder ein und derselben Gattung oder Art können sich in der Gammaempfindlichkeit deutlich unterscheiden. Weiterhin können die Bedingungen vor und während der Bestrahlung wie Wasser- und Sauerstoffgehalt von Enzympräparaten die Anwesenheit oder Abwesenheit von Schutzstoffen und sensibilisierenden Agentien die Bestrahlungsempfindlichkeit der Mikroorganismen beeinflussen (60)

Tab.5: Einfluß der Gamma-Bestrahlung auf die mikrobielle Kontamination verschiedener Pankreatin-Chargen

Vor der Behandlung	Nach der Behandlung					
	^{60}Co Dosis				^{137}Cs	
	0,75	1,2	2,4	5,0	1,2	2,4
	Anzahl aerober Bakterien / g					
P_1 10,000	5,000	2,000	200	10	1,800	300
P_2 3,000	1,000	300	10	10	200	20
P_3 12,000	2,000	200	60	-	1,300	220
	Anzahl Hefen und Schimmelpilze/g					
P_1 100	10	2	-	-	3	2
P_2 5	-	-	-	-	-	-
P_3 50	10	10	-	-	15	-

Tab.6: Einfluß von Isopropanol allein (A) und in Kombination mit Gammastrahlen (B) auf die Lipase-Aktivität und auf die mikrobielle Kontamination verschiedener Pankreatin-Chargen

	Behandlung	
	A	B
	% Lipaseverlust	
P_1	10	22
P_2	16	24
P_3	23	28
	Anzahl aerober Bakterien/g	
P_1	10,000	5,000
P_2	3,000	700
P_3	400	-
	Anzahl Hefen und Schimmelpilze/g	
P_1	10	-
P_2	-	-
P_3	20	20

Es wird angenommen (61), daß die Enzymaktivität bei der Bestrahlung nicht allein durch die direkte Wirkung von Gammastrahlen, sondern auch durch den sekundären Effekt der Wasserradikale abnimmt. In unserem Fall ist der Wassergehalt der Proben ähnlich, jedoch wurden große Unterschiede bezüglich der Lipasezersetzung zwischen ihnen beobachtet. Diese Unterschiede sind zu erwarten, da Pankreatin ein biologisches Material ist, dessen Herkunft und Herstellungsmethoden zu deutlichen Unterschieden zwischen den einzelnen Proben führen können (49,62).

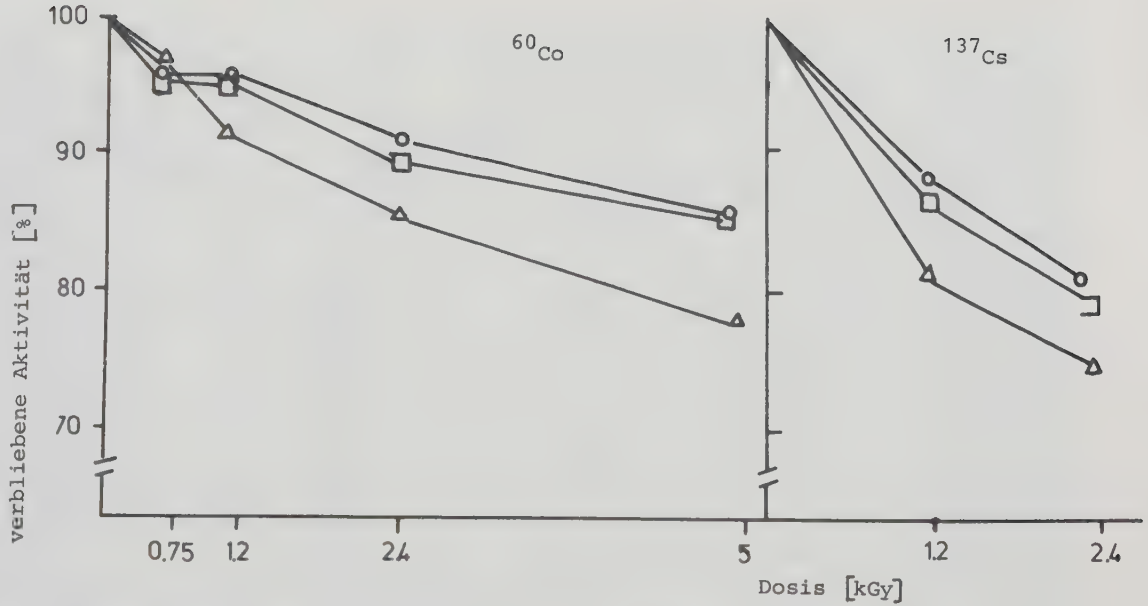

Abb.12: Einfluß der Gamma-Bestrahlung auf die Lipase-Aktivität

o = P_1; □ = P_2; Δ = P_3

Andere Autoren haben berichtet (63, 64), daß der Feuchtigkeitsgehalt keinen Einfluß auf die Strahlenempfindlichkeit der Enzyme hat.

Es wurde von mehreren Arzneistoffen einschließlich Multivitaminen, Ergometrinmaleat, Cortisonacetat, Penicillin G berichtet, daß diese bei einer Dosis von 25 kGy mit ^{60}Co ohne wesentliche Wirkungsverluste entkeimt werden können (65, 66). Verschiedene Arzneibücher empfehlen diese Dosis als Entkeimungsbehandlung für keimarme Artikel (67). Deshalb wurden die Pankreatinproben mit dieser Dosis bestrahlt. Nach dieser Behandlung wurde höhere Abnahme der Lipaseaktivität in der Größenordnung von 43,5% bis 53% und kein Mikrobenwachstum festgestellt. Deshalb soll betont werden, daß die Gammabestrahlungsdosen, welche zur Reduzierung des Keimgehalts verwendet werden, so niedrig wie möglich gehalten werden müssen, damit die Enzymaktivität nicht stark abnimmt. Die Bestrahlung wurde ebenso mit ^{137}Cs bei zwei Dosen von 1,2 und 2,4 kGy durchgeführt. Aus Abb.12 wird deutlich, daß diese Behandlung einen weitaus größeren Verlust als die Behandlung mit ^{60}Co bei denselben Dosen verursacht, wo die Verluste zwischen 13-18% und 20-24% betragen. Aus Tab.5 geht hervor, daß die mikrobielle Kontamination nicht so stark reduziert wurde im Vergleich zu der Behandlung mit ^{60}Co, wo das Gegenteil zutrifft. Jacobs vermutete (68), daß die im Vergleich zu ^{137}Cs höhere Photonenergie von ^{60}Co möglicherweise für die stärkere Zersetzung von Tetracyclin verantwortlich sein könnte. Hier kann nur der Einfluß der Strahlungsleistung berücksichtigt werden. In den letzten Jahren wurden mehrere Untersuchungen (63, 64, 69, 70) veröffentlicht, die bei Verwendung von Gammabestrahlung zur Reduktion des Keimgehalts einiger Enzympräparate keine wesentlichen Aktivitätsverluste annehmen. Lüssi-Schlatter et al. (56) berichteten, daß Pankreatin mit Gammabestrahlung ohne wesentliche Verluste entkeimt werden kann.

Während mehrere Arzneistoffe im festen Zustand eine bemerkenswerte Beständigkeit bei der Bestrahlung zeigen (71, 72, 73), ist die Labilität der Proteine erwiesen (74).

Dies erklärt wohl die hier beobachtete Gamma-Empfindlichkeit des Pankreatins. Außerdem ist in der BRD und in mehreren anderen Ländern die Verwendung von Gamma-Strahlen als Entkeimungsmethode für Lebensmittel und Arzneistoffe noch immer verboten (75, 76).
Deshalb sollte zuerst die gesetzliche Seite dieser Methode berücksichtigt werden.

3.3.3 Isopropanol allein und in Kombination mit Gammastrahlen

Es wurde der Einfluß von Isopropanol allein und in Kombination mit Gammastrahlen auf die Aktivität und den Keimgehalt von Pankreatinproben untersucht. Tab.6 zeigt die Wirkung von Isopropanol auf Lipase. Die Lipaseverluste sind deutlich und bewegen sich zwischen 10 und 23 Prozent. Keimzahlversuche zeigen in Tab.6, daß die bakterielle Kontamination von P_1 und P_2 unbeeinflußt bleibt. Hingegen wirkt Isopropanol stark antimikrobiell gegen die Bakterien von P_3 und gegen die Pilze von P_1 und P_2. Lüssi-Schlatter und Speiser (55) haben Isopropanolwirkung als wirksame antimikrobielle Behandlung für Pankreatin ohne wesentlichen Aktivitätsverlust vorgeschlagen. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch die Verschiedenheit der verwendeten Pankreatinproben bedingt sein.
Eine Kombination von Isopropanol und Gammastrahlen verursacht Verluste von etwa 22 bis 28%, welche höher sind als die Verluste, welche bei der Behandlung mit Isopropanol oder Gammastrahlen alleine auftreten, die aber geringer sind als die Verluste der Einzelbehandlungen zusammengerechnet. Die in Tab.6 dargestellten Überlebensraten zeigen, daß die Kombinationsbehandlung nur bei P_3 wirksam ist, während bei P_1 und P_2 der Rückgang der Keimzahl möglicherweise ausschließlich der Gammabestrahlung zuzuschreiben ist.
Es ist deutlich, daß Isopropanol allein oder in Kombination mit Gamma-Strahlen nicht als allgemein wirksame antimikrobielle Behandlung von Pankreatin betrachtet werden kann.

3.3.4 Ethylenoxid (EO)

Tab.7 zeigt den Lipaseverlust in Prozent unter Verwendung von EO bei verschiedenen Bedingungen. Die erste Behandlung verursachte 8 bis 28% Lipaseverluste. Ähnlich wie bei anderen vorhergehenden antimikrobiellen Behandlungen ist P_3 empfindlicher gegen EO-Einwirkung als die anderen zwei Proben. Nach dieser Behandlung wurde kein Mikrobenwachstum mehr festgestellt.

Bei EO-Einwirkung gibt es vier grundlegende kontrollierbare Variablen (77, 78), nämlich: Einwirkungszeit, Temperatur, Gaskonzentration und Feuchtigkeit. Zusätzlich gibt es noch andere Variable wie die Keimzahl, Art der mikrobiellen Kontamination und die bestehenden Schutzbarrieren (79, 80). In dieser Untersuchung wurde im Interesse der Enzymstabilität nur bei Raumtemperatur gearbeitet.

Um weniger Lipasezersetzung zu erreichen, wurde bei der zweiten Behandlung ein kürzerer Zeitablauf, aber mit ähnlicher Gaskonzentration wie bei der ersten Behandlung verwendet. Aber die Lipaseverluste sind zwischen 6 und 21% und damit noch immer hoch, besonders bei P_3. Auch war kein mikrobielles Wachstum nach dieser Behandlung festzustellen. Bei der dritten Behandlung wurde die gleiche Aussetzungszeit aber mit einer geringeren Gaskonzentration (0,85 kg/m) benutzt. Wie Tab.7 zeigt, wurden weniger Lipaseverluste (3 bis 12%) ermittelt. Diese Behandlung zeigt eine wirksame Reduzierung des Keimgehaltes der Proben, besonders wenn die anfängliche Keimzahl nicht zu hoch ist. Bei der vierten Behandlung wurden ein langer Zeitablauf (64 Stunden) und eine sehr niedrige Gaskonzentration (0,28 kg/m^3) verwendet.

Tab.7: Einfluß verschiedener Ethylenoxid-Behandlungen auf die Lipase-Aktivität und mikrobielle Kontamination verschiedener Pankreatin-Chargen

	Behandlung				
	I	II	III	IV	V
	% Lipaseverlust				
P_1	8	6	3	2	0
P_2	11	8	5	8	5
P_3	28	21	12	18	7
	Anzahl aerober Bakterien/g				
P_1	-	-	1,000	-	3,000
P_2	-	-	80	-	360
P_3	-	-	300	-	400
	Anzahl Hefen und Schimmelpilze/g				
P_1	-	-	-	-	10
P_2	-	-	-	-	-
P_3	-	-	-	-	2

Tab.8: Einfluß der Preßkraft auf die mikrobielle Kontamination verschiedener Pankreatin-Chargen

	Preßkraft (kN)			
	1	3	5	10
	Anzahl aerober Bakterien/g			
P_1		3,000	2,500	2,000
P_2		650	300	280
P_3	1,800	1,200	500	400
	Anzahl Hefen und Schimmelpilze/g			
P_1		-	-	-
P_2		-	-	-
P_3	10	6	4	4
	Enterobateriaceen in P_3			
P_3	+	-	-	-

Die berechneten Lipaseverluste sind im Bereich von 2-17%, und alle Proben zeigen keinen Keimwachstum. Diese Behandlung scheint eine geeignete Methode für P_1, wo nur unbedeutende Verluste auftreten, zu sein. Bei der letzten Behandlung wurden die Einwirkungszeit auf 2 Stunden und die Gaskonzentration auf 0,32 kg/m stark reduziert. Die Enzymaktivität blieb gut erhalten, da nur Lipaseverluste zwischen 0 und 6% berechnet wurden. Die Keimreduktion ist bei P_2 und P_3 fast die gleiche wie im Fall der dritten Behandlung, aber es wurde eine ausgesprochen geringere Reduzierung der Ausgangskontamination von P_1 beobachtet. Diese Behandlung erscheint als geeignete Methode für P_3. Unter bestimmten Bedingungen eignet sich also EO zur Reduzierung der Keimzahl von Pankreatin ohne wesentliche Enzymverluste. Die Veränderung der genannten vier grundlegenden Parameter ermöglicht es, die EO-Behandlung als eine generelle Entkeimungsmethode für Pankreatin einzusetzen.

In diesem Zusammenhang muß aber erwähnt werden, daß in den letzten Jahren gesteigerte Aufmerksamkeit hinsichtlich möglicher biologischer Bedeutung von EO-Rückständen in Arzneipräparaten zu beobachten ist. Dieser Punkt ist von Willson sehr gut nachgeprüft (81). Es ist bekannt, daß EO ein stark alkylierendes Reagens ist, das gegenüber biologischen Molekülen, ob menschlich oder mikrobiell, sehr reaktiv ist. Deshalb muß eine Schädigung menschlichen Gewebes erwartet werden, falls Rückstände von EO in einem Arzneimittel vorhanden sind. Weitere Nachteile von EO sind, daß es mehr Aufmerksamkeit kostet, das ganze Verfahren zu überwachen als bei der Bestrahlung. Außerdem sind Sporenpäckchen zur Kontrolle jeder Charge erforderlich.

Weiterhin mußte in dieser Untersuchung jede Pankreatinprobe unter anderen Bedingungen behandelt werden, um minimale Lipasezersetzung und maximale Keimgehaltsreduktion zu erreichen. Neulich wurde in einer Studie (82) die cytogenetische Wikrung von EO untersucht. Es wurde berichtet, daß Krankenhausbeschäftigte, deren Aufgabe es ist, Medikamente

durch EO zu entkeimen, signifikante Zunahme der Schwesterchromatiden-Austauschrate im Vergleich zu geschützten Beschäftigten zeigten. Deshalb sollen notwendige Maßnahmen gegen die EO-Nachteile ergriffen werden.

3.3.5 Verminderung der Keimzahl von Pankreatin allein durch die Preßkraft beim Tablettiervorgang

Entsprechend Graf und Sakr (29) werden die Pankreasenzyme teilweise beim Tablettiervorgang beeinträchtigt. Das Zersetzungsausmaß ist von der Hilfsstoffart und der Preßkraft abhängig. Hüttenrauch und Keiner (34) haben einen Verlust von 12,6% bei Verpressung von Pankreatin bei 19,5 kN festgestellt. Horiskoshi et al. (83) haben geschlossen, daß die teilweise Zersetzung von Proteasen auf die angewandte Scherkraft beim Tablettiervorgang zurückgeführt werden kann. Daraus ergibt sich, daß die entwickelten Scherkräfte im Laufe des Tablettiervorganges auch die Zellen von Kontaminationskeimen schädigen können. Deshalb wurde dieses Phänomen zur Reduzierung der Keimzahl von Pankreatin studiert. Mittels einer Tablettenmaschine wurde der Einfluß der Preßkraft auf die Keimzahl in Tabletten und Briketts aus verschiedenen Pankreatinproben untersucht. Der Einfluß der Preßkräfte auf die Lipaseaktivität der Preßlinge wurde ermittelt. Aus den Überlebensraten in Tab.8 und 9 geht hervor, daß in beiden Formen die Keimzahl auch bei sehr niedriger Preßkraft stark reduziert wurde.

Bei Ausübung verschiedener Preßkräfte zur Brikett-Herstellung wurde festgestellt, daß die Keimzahl proportional mit der Preßkraft reduziert wurde. Wie auch mit den anderen Entkeimungsmethoden, war die mikrobielle Kontamination von P_1 und P_2 nicht zu beseitigen.

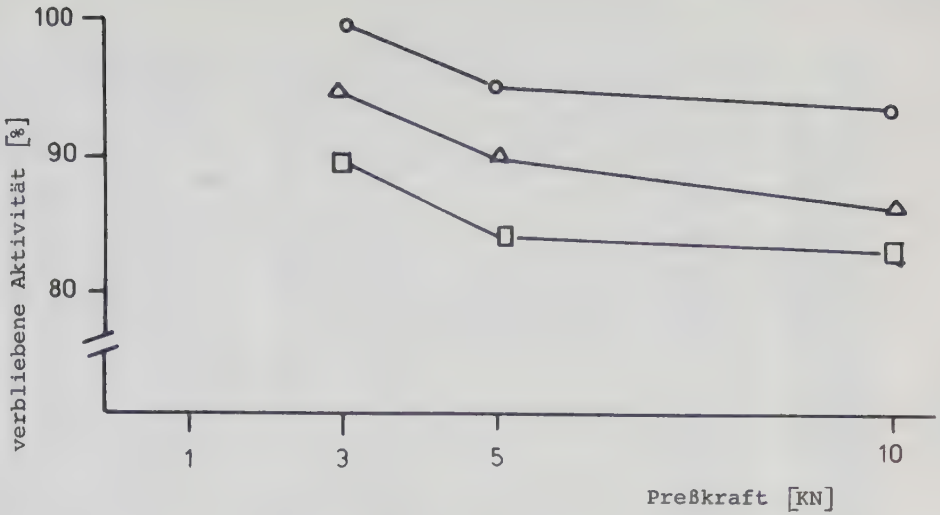

Abb.13: Einfluß der Preßkraft auf die Lipase-Aktivität
Zeichenerklärung: siehe Abb.12

Tab.9: Einfluß des Tablettiervorganges auf die mikrobielle Kontamination einiger Pankreatin-Tablettenmischungen

	Anzahl aerober Bakterien/g		Anzahl von Hefen und Schimmelpilzen/g	
	vor Kompression	nach	vor Kompression	nach
P_1	5,000	1,000	50	6
P_2	2,000	200	4	-
P_3	6,000	200	30	4

Die prozentualen Lipaseverluste bei der Herstellung von Pankreatingranulaten durch Kompaktierung sind in Abb.13 dargestellt. Es wird deutlich, daß die Enzymaktivitätsverluste von den Pankreatinproben abhängig sind. Die Verluste sind im Bereich von 0 bis 16,7%.

Das Absterben der Mikroben wird möglicherweise durch das Zerreißen von Zellen bei Pressung hervorgerufen. Es könnte auch möglich sein, daß die anzunehmende Temperaturerhöhung während des Tablettiervorganges die Keimreduktionsrate verstärkt.

Diese Entdeckung kann als eine annehmbare Methode zur Entkeimung der Pankreatinpulver verwendet werden. Haupvorteile dieser Methode sind die Umweltfreundlichkeit und das Wegfallen zusätzlicher Enzymaktivitätsverluste, da nach meiner Erfahrung bei Verarbeitung therapeutisch dosierter Pankreatintabletten eine Granulierung vor der Tablettierung erforderlich ist. Die vorgeschlagene Methode ist billig und sehr einfach im Vergleich zur Ethylenoxid- oder Gamma-Bestrahlung.

3.3.6 Einfluß von mikrobieller Kontamination und verschiedenen Entkeimungsmethoden auf die Lipase-Aktivität bei der Lagerung

Über die Zersetzung von Pankreatinpräparaten bei der Herstellung oder durch Wechselwirkung mit anderen Arznei- oder Hilfsstoffen wurde aus diesem Labor und von anderen Autoren berichtet (16, 50, 84-87).

Da bisher keine Untersuchungen vorliegen, welche die Einflüsse mikrobieller Kontamination oder die Auswirkung verschiedener Entkeimungsmethoden auf die Lipase-Aktivität bei Lagerung zeigen, wurde diese Studie in Angriff genommen. Abb.14 zeigt den negativen Effekt mikrobieller Kontamination auf die Lipaseaktivität deutlich. Die Lipaseverluste bei den unbehandelten Proben sind viel größer als bei den behandelten. Diese Ergebnisse demonstrieren, daß die Entkeimung von Pankreatin erforderlich ist. Abb.14 zeigt deutliche Unterschiede der Lipaseverluste zwischen den verschieden behandelten Proben. Die bestrahlten und die mit EO behandelten Proben können die Aktivität am besten bewahren, während die mit Isopropanol allein oder in Kombination mit Gamma-Strahlen behandelten Proben vergleichsweise die geringste Aktivität aufweisen. Das ausgezeichnet stabile Verhalten, das die bestrahlten Proben zeigen, stimmt nicht mit früheren Versuchen von Wallhäußer (52) überein. Es berichtete, daß die Enzymaktivität bestrahlter Proben von Bac. subtilis-Proteasen während der Lagerung stärker als die von unbestrahlten Proben abnimmt.
Die Lipaseaktivitätsabnahme der Proben, die mit EO behandelt wurden, ist größer als bei den bestrahlten Proben, obwohl beide kein Keimwachstum vor dem Lagerungsversuch zeigten. Dies könnte durch die Wirkung der EO-Rückstände erklärt werden. Ein Einfluß durch erneutes Keimwachstum bei Lagerung ist auszuschließen, weil bei der Keimzahlbestimmung nach der Lagerungsperiode kein Wachstum mehr festgestellt werden konnte.

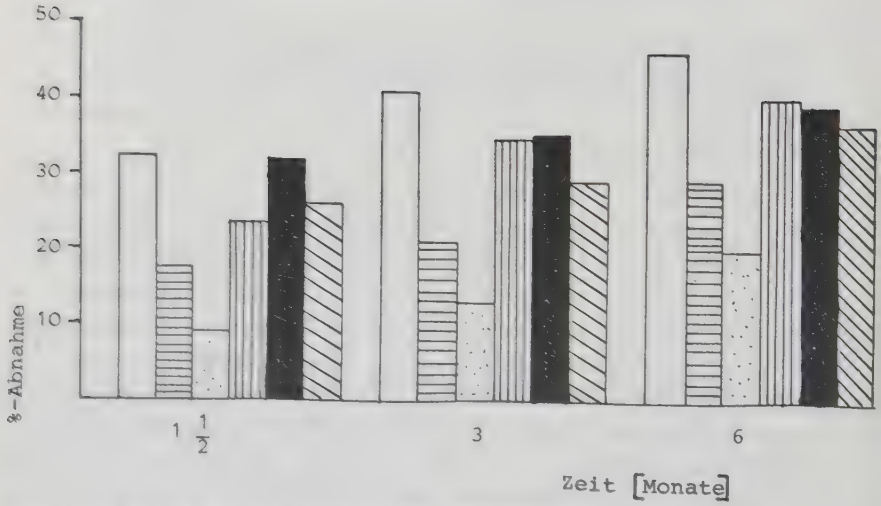

Abb.14: Einfluß von mikrobieller Kontamination und verschiedenen Entkeimungsmethoden auf die Lipase-Aktivität bei Lagerung bei 37°C.

□= unbehandeltes Pankreatin (P_1); ▤= Ethylenoxid;
▥= Isopropanol + Gamma-Strahlen; ⁘ = Gamma-Strahlen;
■= unbehandeltes Pankreatin (P_3); ▨ = Isopropanol

Graf[+] und Nada haben festgestellt, daß Pankreatingranulate stabiler sind als gepulvertes Pankreatin gleicher Herkunft.
Die Lipaseaktivität der Proben nach Behandlung mit Isopropanol allein oder in Kombination mit Gamma-Strahlen sinkt stark bei Lagerung im Vergleich mit den anders behandelten Proben ab. Die Verminderung der Lipase-Aktivität durch Alkohole ist wohl erwiesen (84, 88).
So soll eine vor einem umfassenden Urteil über die Eignung einer Entkeimungsmethode für Pankreatin eine Lagerungsuntersuchung durchgeführt werden.

+) Bisher unveröffentlichte Versuche

Kapitel 4 Der Einfluß der Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin auf die Lipaseaktivierung und Tabletteneigenschaften

4.1 Einleitung

Im Laufe des letzten Jahrhunderts wurde bekannt, daß Gallensalze die Fettabsorption erhöhen aufgrund ihrer Wirkung auf die Lipase (89). In vitro könnten die Gallensalze das Ausmaß der Lipasewirkung steigern oder vermindern (90, 91).

Unterschiede in der Enzymreinheit, komplizierte Bestimmungsmethoden und die Verschiedenheit der benutzten Substrate könnten einige der Meinungsverschiedenheiten erklären.

Trotz der andauernden Forschungsaktivitäten bezüglich der Einflüsse von Gallensalzen auf die Lipolyse blieb die Aufklärung der genauen Mechanismen der gegenseitigen Beeinflussung von Lipase, Gallensalzen und Co-Lipase unklar.

Während Wills (92) den Einfluß der Gallensalze lediglich der Substrat-Emulgierung zuschrieb, behaupteten andere, daß die Salze die Adsorption erleichtern und den Kontakt der Lipase mit den Fett-Tropfen verbessern (90, 93, 94).

Viele der auf dem Markt befindlichen Pankreatin-Zubereitungen sind mit Gallensalzen kombiniert, mit der Hoffnung, die Lipaseaktivität zu erhöhen.

Jedoch befaßt sich der größte Teil der Literatur mit hochgereinigten Lipasen und Gallensalzen und keine Untersuchung mit Handelspankreatin und Gallensalzen in pharmazeutischen Zubereitungen. Aus diesem Grund soll das vorliegende Kapitel über die Effektivität der Kombination von Gallensalzen mit Handelspankreatin-Mustern verschiedener Hersteller bezüglich der Lipase-Aktivität und der physikalischen Eigenschaften daraus hergestellter Tabletten berichten.

4.2 Beschreibung der Versuche

4.2.1 Materialien

Pankreatin P_1, P_2, P_3 (Danimex, Hamburg; Kali-Chemie Pharma, Hannover; Nordmark-Werke, Hamburg), Avicel PH 102, Polyplasdone XL, Natrium-Deoxycholat, Natrium-Taurocholat (Fluka AG, Buchs), Natrium-Cholat (Sigma, St.Louis, Mo. USA), Ochsengalle (Merck AG, Darmstadt), Natrium-Taurocholat (Gent, Belgien).

4.2.2 Lipase-Bestimmung

Die Lipase-Aktivität wurde nach der FIP-Methode bestimmt.

4.2.3 Bestimmungsmethoden des Einflusses von Gallensalzen auf die Lipase-Aktivität

4.2.3.1 Einfluß von Gallensalzen auf die Lipase-Aktivität von Handels-Pankreatinen

Natrium-Taurocholat FIP, Na-Deoxycholat, Na-Cholat, Na-Taurocholat und Ochsengalle wurden in Konzentrationen von 1% (= 10 mM, was der physiologischen Gallenkonzentration ungefähr entspricht (15)) zur Bestimmung ihres Einflusses auf die Lipase-Aktivität von P_1, P_2 und P_3 eingesetzt.

4.2.3.2 Einfluß der Na-Deoxycholat-Konzentrationen

Verschiedene Konzentrationen (0-4%) Na-Deoxycholat wurden zur Abschätzung des Effekts auf die Lipase-Aktivität von P_1, P_2 und P_3 benutzt.

4.2.3.3 Bedeutung der Gallensalz-Konzentration

Na-Salze der Deoxycholsäure, Cholsäure, Taurocholsäure und Ochsengalle in Konzentrationen von 0-4% wurden zur Bestimmung ihrer Wirkung auf die Lipase-Aktivität von P eingesetzt.

4.2.4 Bestimmung der Lipase-Adsorption an Öl-Wasser-Oberflächen

Die Pankreatin-Suspension von P_1 wurde bei 6000 Upm 15 min lang zentrifugiert. 2 ml der klaren Enzymlösung wurden zu einer Mischung aus 2 ml Olivenöl-Emulsion (15), 2 ml Pufferlösung (pH 7) und 2 ml Gallensalzlösung oder Wasser gegeben. 1 min lang geschüttelt und dann 10 min bei 5000 Upm und einer Temperatur von 5°C zentrifugiert. 0,5 ml der klaren wäßrigen Phase wurde für die Bestimmung der Lipase-Aktivität verwendet. Die Menge an der Oberfläche adsorbierter Lipase wurde als Differenz zwischen der Lipase-Aktivität in An- und Abwesenheit der Gallensalze berechnet.

4.2.5 Messung der Diffusion von Ölsäure aus Öl-Wasser-Grenzflächen

Eine Mischung aus 40 ml Olivenöl und 20 ml Ölsäure wurde mit Gummi arabicum emulgiert (15). 5 ml der fertigen Emulsion wurden zu 10 ml Gallensalzlösung oder Wasser in eine 50 ml-Glasflasche gegeben und bei 120 Upm 2 Stunden lang im thermostatisierten Wasserbad bei 37°C geschüttelt. Nach Verdünnen von 5 ml dieser Lösung mit 15 ml Wasser wurde schnell potentiometrisch mit 0,1N-NaOH bis pH 9 titriert. Die Menge an der diffundierten Ölsäure wurde aus der Differenz zwischen der Lipase-Aktivität in An- und Abwesenheit von Ölsäure (bei identischen Versuchen) berechnet.

4.2.6 Bestimmung der kinetischen Parameter der Lipase-Reaktion

4.2.6.1 Einfluß der Gallensalze

Die kinetischen Parameter der Lipase-Reaktion wurden unter Verwendung verschiedener Substratkonzentrationen mit 1% Na-Deoxycholat, Cholat, Taurocholat und Ochsengalle bestimmt.

4.2.3.6.2 Pankreatin verschiedener Hersteller

Die kinetischen Parameter der Lipase (P_1, P_2, P_3)-Reaktion wurden durch den Einsatz verschiedener Substrat-Konzentrationen mit 1% Taurocholat (FIP) bestimmt.

4.2.7 Einfluß der Gallensalze auf die physikalischen Eigenschaften der Tabletten

4.2.7.1 Auswahl der Tablettierrezeptur und Herstellung der Tabletten

Reihenuntersuchungen an Pankreatin-Gallensalz-Tabletten des Handels haben gezeigt, daß die Verhältnisse Pankreatin : Gallensalz i.a. 10 : 1, 10 : 2,5, 10 : 5 und 10 : 10 sind.
Für diese Arbeit wurde das 2. Verhältnis gewählt.

Rezeptur:

Pankreatin	100 Teile
Avicel 102	100 Teile
Gallensalze	25 Teile
Polyplasdone XL	10%
Mg-Stearat	1%

Die Tablettierung erfolgte auf einer instrumentierten KORSCH-Exzentermaschine, mit Dehnungsmeßstreifen am Oberstempel. Für diese Zubereitung wurde eine Oberstempel-Preßkraft von 2,5 kN aufgewandt.

4.2.7.2 Physikalische Eigenschaften

Die Gleichförmigkeit von Gewicht und Dicke, Zerfallszeit, Bruchfestigkeit und Abrieb wurden, wie im experimentellen Teil beschrieben, geprüft.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Einfluß von Gallensalzen auf die Lipase-Aktivität

4.3.1.1 Vergleichende Aktivierung

Abb.15 zeigt, daß Lipase durch Ochsengalle, Deoxycholat, Cholat und Taurocholat in Konzentrationen von 1% unterschiedlich aktiviert wurde. Im allgemeinen aktivieren Deoxycholat und Cholat die Lipase stärker als Ochsengalle und Taurocholat. Diese Beobachtung wurde auch von mehreren Autoren (90, 95) bestätigt.

Es wird deutlich, daß Pankreatin verschiedener Hersteller durch Gallensalze sehr unterschiedlich aktiviert wird. Es ist hier erwähnenswert, daß Taurocholat FIP die Lipase zweimal stärker als Handels-Taurocholat aktiviert. Dies betont die Bedeutung der Qualität der Gallensalze für die Steuerung der Enzymaktivierung nachdrücklich.

4.3.1.2 Einfluß der Na-Deoxycholat-Konzentration

Die Lipase-Aktivierung durch Deoxycholat (0-4%) zeigt Abb.16. Es ist offenbar, daß Pankreatin verschiedener Hersteller (P_1, P_2, P_3) sich gegenüber Gallensalzen ähnlich verhielt. Die Lipase-Aktivierung ist bei Erhöhung der Deoxycholat-Konzentration bis zu 0,125-0,25% -was der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) entspricht- erhöht; darauf folgt Hemmung und danach findet man wieder Erhöhung der Lipolyse. Abb.16 zeigt deutlich, daß Gallensalze in vormizellaren Konzentrationen die Fettspaltung aktivieren. Dies wurde von Brockerhoff (96) als ein Schutz der Lipase vor der Inaktivierung durch Entfalten der hydrophoben Oberfläche des Substrates interpretiert.

Der Hemmungseffekt der Gallensalze auf die Lipase-Aktivitätt durch Erhöhung der Konzentration wurde als Ausbildung einer Monolayer-Schicht an den Substratoberflächen beschrieben (97), dadurch kann die Lipase ihr Substrat nicht erreichen.

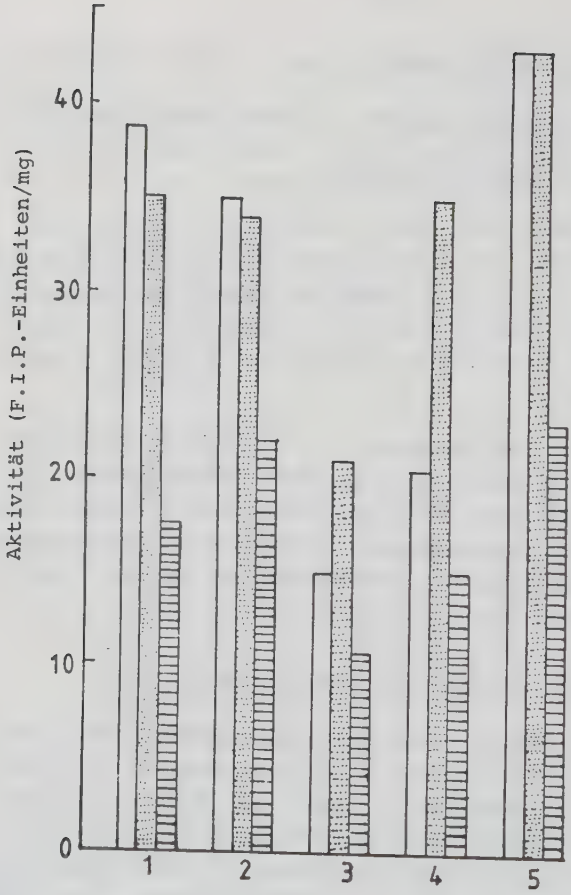

Abb.15: Vergleichende Aktivierung der Lipase verschiedener Pankreatin-Chargen durch Gallensalze.

□ = P_1; ⊡ = P_2; ▤ = P_3

1 = Deoxycholat; 2 = Cholat; 3 = Taurocholat;
4 = Ochsengalle; 5 = Taurocholat (F.I.P.)

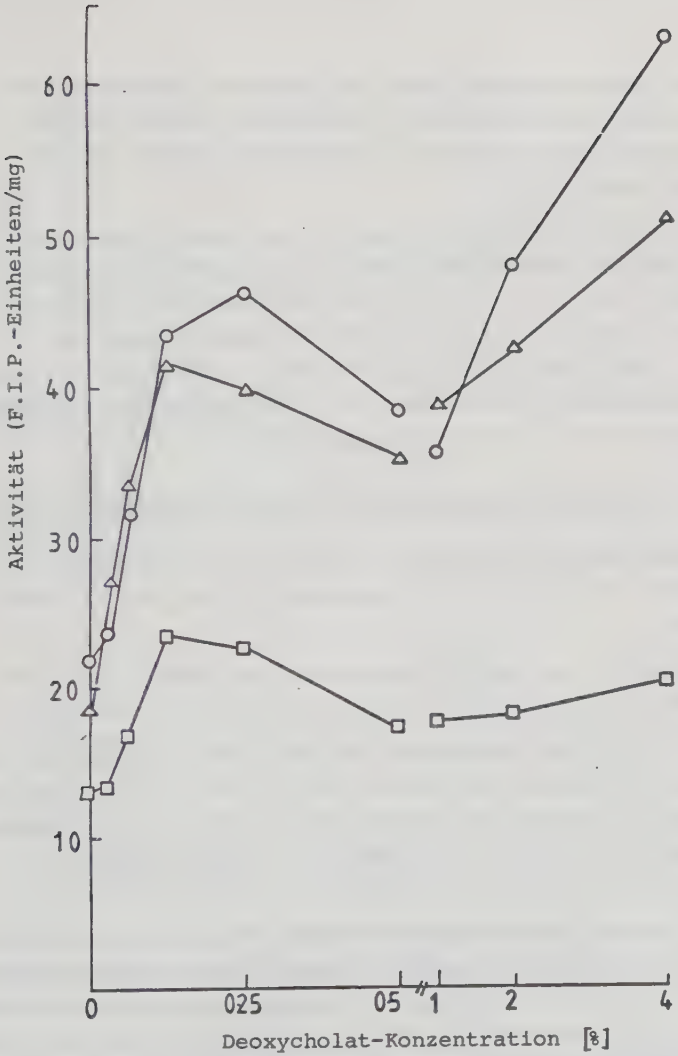

Abb.16: Einfluß der Deoxycholat-Konzentration auf die Lipase-Aktivierung verschiedener Pankreatin-Chargen.

o = P_2; Δ = P_1; □ = P_3

Die Gallensalze können auch eine negative Ladung an die Substratoberfläche abgeben, und deshalb kann auch die elektrostatische Abstoßung ein wichtiger Faktor für die Hemmung sein.

Eine weitere Erhöhung der Deoxycholat-Konzentration brachte noch einen weiteren bedeutenden Anstieg der Lipase-Aktivierung. Dies kam (nach der obigen Diskussion) unerwartet. Es kann folglich nötig sein, die Enzym-Adsorption an Öl-Wasser-Grenzflächen sowie die Diffusion und Solubilisierung der Fettsäuren zu untersuchen um dieses Phänomen zu klären, wie später noch erörtert werden wird.

4.3.1.3 Einfluß verschiedener Gallensalz-Konzentrationen

Die Auswirkung verschiedener Gallensalze in Konzentrationen von 0-4% auf die Lipase-Aktivierung wird in Abb.17 demonstriert.

Es wird klar, daß sowohl Deoxycholat und Cholat, als auch Ochsengalle und Taurocholat sich verschieden verhielten:

Die beiden ersten Substanzen zeigten anfängliche Zunahme, gefolgt von Hemmung und darauf wieder eine Verstärkung der Lipase-Aktivierung bei Erhöhung der Konzentration. Dagegen zeigten die beiden letzten Substanzen einen anfänglichen Anstieg, auf den Hemmung der Fettspaltung folgte.

Um die Hemmung der Lipolyse durch Gallensalze zu erklären, wurden verschiedene Theorien vorgeschlagen. Eine davon bezieht sich auf die CMC der Gallensalze, wie oben diskutiert wurde. Eine andere meint, daß die Gallensalze mit der Lipase reagieren und einen Komplex mit sehr geringer Affinität zum Substrat bilden (98).

Die Galle enthält neben den Gallensalzen einen bestimmten Galle-Lipoprotein-Komplex, der die Lipase-Aktivität hemmen kann (99). Es ist erwähnenswert, daß Colipase in Pankreatin-Handelsprodukten enthalten sein kann, was der Lipase einen guten Schutz bietet in Gegenwart höherer Gallenkonzentrationen bei einem pH von 6,5-7,5 (97). Diese Erscheinung hat in unserer Untersuchung keine Rolle gespielt, da die Reaktion bei pH 9 ablief.

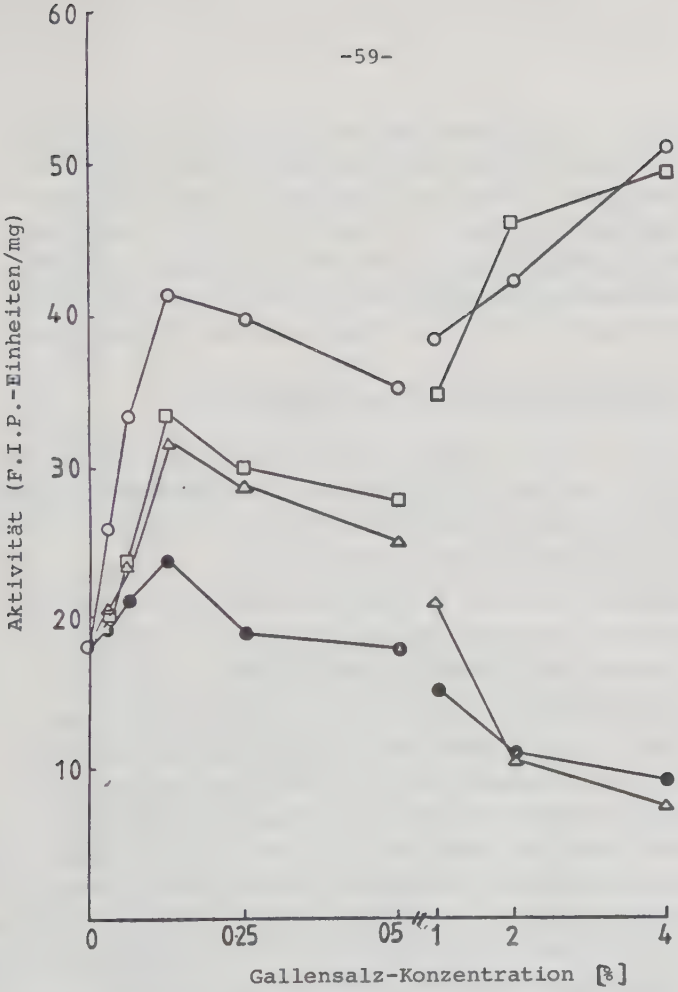

Abb.17: Einfluß verschiedener Gallensalz-Konzentrationen auf Lipase-Aktivierung des P_1

O = Deoxycholat; □ = Cholat; Δ = Ochsengalle;

● = Taurocholat

Weiterhin wurde bei Anwendung der Olivenöl-Arabischgummi-Methode berichtet (100), daß Aktivitätsabnahme zu beobachten war, wenn Lipase und Colipase mit steigenden Mengen Galle vorbebrütet wurden. Die Autoren stellten fest, daß die gleichzeitige Gegenwart von Galle und Arabischgummi für diese niedrige Aktivität verantwortlich ist und nicht durch die Anwesenheit von Colipase geändert werden kann.

4.3.2 Lipase-Adsorption an der Grenzfläche

Abb.18 zeigt, daß die Lipase-Adsorption durch Erhöhung der Deoxycholat- und der Cholat-Konzentration ansteigt, während Ochsengalle und Taurocholat anfängliche Zunahme gefolgt von Hemmung der Adsorption des Enzyms zeigen.

Beim Vergleich von Abb. 17 mit Abb.18 wird klar, daß ein ziemlich guter Zusammenhang zwischen der Lipase-Aktivität und der Menge adsorbierter Enzyme besteht.

So kann angenommen werden, daß die Beschleunigung oder Hemmung der Lipolyse durch Gallensalze zum Teil mit der Adsorption des Enzyms an den Oberflächen zusammenhängt. Diese Annahme deckt sich mit den gefundenen Daten (94). Die Autoren stellten fest, daß eine der wesentlichsten Funktionen der Gallensalze auf die Lipase eher darin liegt, die Enzymadsorption an der Öl-Wasser-Grenzfläche zu erhöhen, anstatt als echter Lipase-Aktivator zu wirken oder das Substrat zu emulgieren.

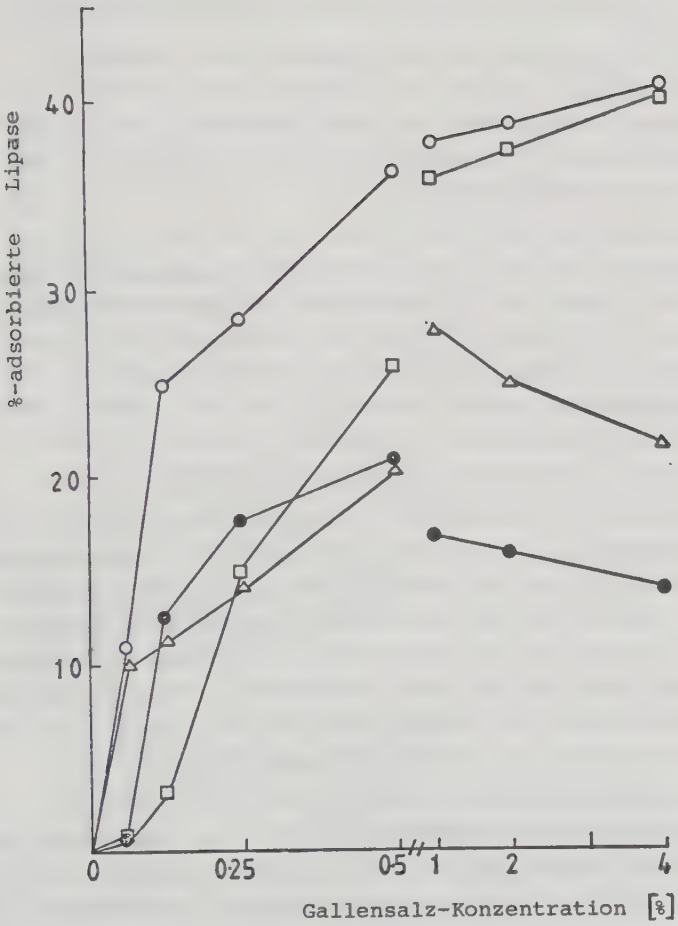

Abb.18: Einfluß der Gallensalze auf Lipase-Adsorption an der Öl - Wasser Grenzfläche.
Zeichenerklärung: siehe Abb.17

4.3.3 Diffusion der Ölsäure aus Öl-Wasser-Grenzflächen

Es ist gut bekannt, daß die Lipolyse durch langkettige Fettsäuren, die während der Enzymreaktion auftreten, gehemmt wird (101). Daher muß ihre Entfernung aus den Oberflächen als ein wesentlicher Faktor für den Verlauf der Reaktion angesehen werden.

Abb.19 zeigt den Einfluß der Gallensalze auf die Diffusion der Ölsäure. Es wird klar, daß die Diffusionsgeschwindigkeit sehr klein ist, bis Gallensalze in bestimmter Konzentration (0,3%) über ihrer CMC hinzugefügt werden; danach wird die Umsetzungsrate besonders durch Deoxycholat, Cholat und Ochsengalle, weniger durch Taurocholat, erhöht. Somit erhöhen die Gallensalze die Diffusionsgeschwindigkeit und die Solubilisierung der Ölsäuren beträchtlich.

Aus den Abb. 17-19 wird offensichtlich, daß bei höheren Konzentrationen von Deoxycholat und Cholat die Enzymadsorption die Diffusion und die Solubilisierung der Fettsäuren ansteigen; folglich ist auch die Aktivierung stärker. Hingegen senken Ochsengalle und Taurocholat die Lipase-Adsorption; erstere erhöht die Diffusion von Ölsäure deutlich stärker als letztere, jedoch ist ihre Wirkung auf die Lipolyse bei höheren Konzentrationen ähnlich herabgesetzt.

Die Beschleunigung der Diffusion von Fettsäuren wurde auch von mehreren Autoren beschrieben (94). Die Gallensalze entfernen die Fettsäuren aus den Oberflächen durch Bildung wasserlöslicher Moleküle oder micellarer Verbindungen (102).

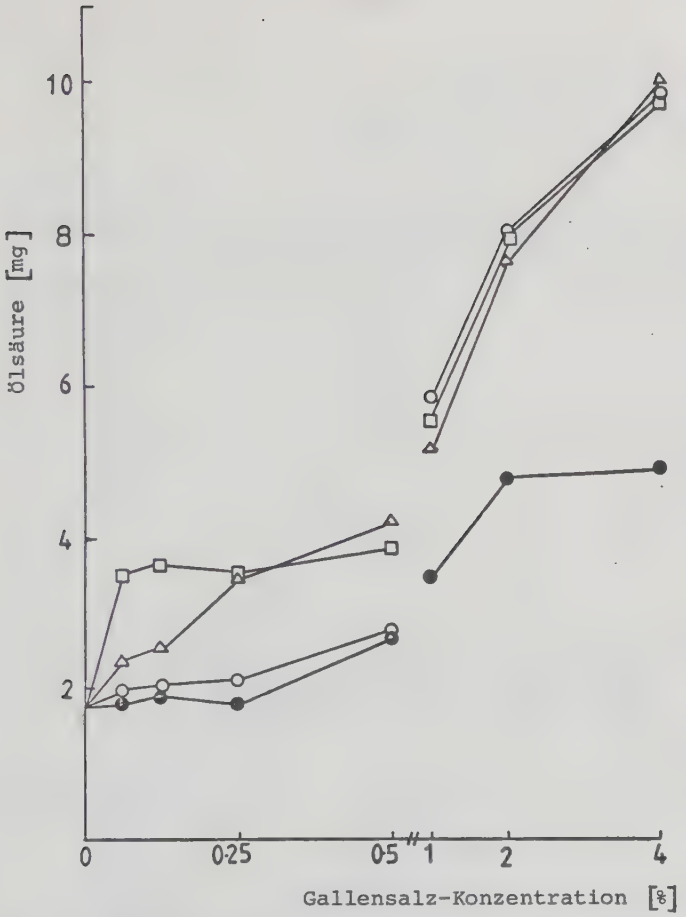

Abb.19: Einfluß der Gallensalze auf die Diffusion der Ölsäure aus den Grenzflächen.
Zeichenerklärung: siehe Abb.17

4.3.4 Kinetische Studien

4.3.4.1 Einfluß der Gallensalze

Tab.10: Die kinetischen Parameter der Lipolyse-Reaktion ohne und mit Gallensalz-Zugabe

Gallensalz	a) Km (mg)	b) Vmax (mg/min)
-	398,8	3,85
Cholat	148,3	8,55
Deoxycholat	109,5	6,91
Ochsengalle	412,9	6,16
Taurocholat	1054,0	8,33

Tab.11: Die kinetischen Parameter der Lipolyse-Reaktion verschiedener Pankreatin-Chargen

Pankreatin	a) Km (mg)	b) Vmax (mg/min)
P_1	72,1	5,64
P_2	79,0	8,45
P_3	100,2	4,81

a= Michaelis-Konstante

b= Geschwindigkeitsmaß für den Zusammenbruch des Enzym-Substrat-Komplexes

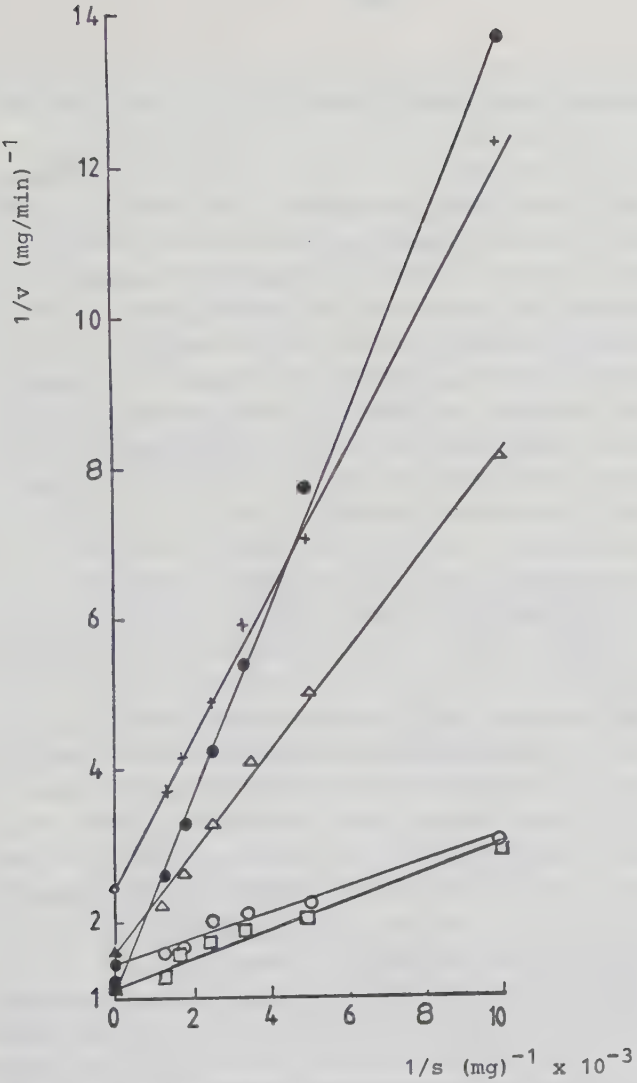

Abb.20: Lineweaver-Burk-Graphik der Lipase-Aktivität ohne und mit Gallensalz-Zugabe.
+ = ohne Gallensalze,
weitere Zeichenerklärung: siehe Abb.17

Die kinetischen Parameter der Lipolyse-Reaktionen wurden unter Verwendung der Michael-Menten-Formel (103, 104) bestimmt.
Die Lineweaver-Burk-Graphik sowie die Km und V-max-Werte sind in Abb.20 und Tab.10 aufgeführt. Der Km-Wert ist 398,8 mg (ohne Galle) und bei Zunahme von Deoxycholat und Cholat wurde er auf 109,5 bzw. 148,3 mg reduziert. Hingegen hat sich bei Verwendung von Ochsengalle der Km-Wert nicht geändert und er erhöhte sich beträchtlich mit Taurocholat.
Die Km-Werte geben die Affinität des Enzyms zum Substrat wieder. Ein niedriger Km-Wert weist normalerweise auf erleichterte Michaelis-Komplexbildung und besseren Zusammenhalt zwischen Enzym und Substrat hin (103). Damit stimmen die in Tab.10 angegebenen Km-Werte überein mit dem Einfluß der Gallensalze auf die Lipase-Aktivierung, wie Abb.17 zeigte. Aus den V-max-Werten (Tab.10) geht hervor, daß diese durch Zugabe von Gallensalzen beträchtlich erhöht werden. Da V-max als Geschwindigkeitsmaß für den Zusammenbruch des Enzym-Substrat-Komplexes definiert ist, wird daraus klar, daß die Zugabe von Gallensalzen die Lipolyse erleichtert.
Es ist wichtig, sich hier bewußt zu sein, daß die Faktoren, die die Geschwindigkeit der Enzymreaktion beeinflussen, ihre Wirkung auf 2 verschiedenen Wegen entfalten können: entweder über Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (Km) oder der Komplexbruch (V-max), oder durch beides (104). So hängen diese beiden Km und V-max-Werte mit den beiden vorgeschlagenen Stufen der ganzen Enzymreaktion zusammen.
Die Bestimmung vom Km und V-max ermöglicht es, die beiden Reaktionsstufen des Enzyms getrennt zu untersuchen. Die berechneten Parameter in Tab.10 weisen darauf hin, daß die Lipase-Affinität an den Emulsionsgrenzflächen, die durch die Km-Werte wiedergegeben wird, in der Enzymreaktion als sehr wichtig betrachtet werden kann.
So dürfte die Lipase-Adsorption an der Grenzfläche Öl-Wasser der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fettspaltung sein, was übereinstimmt mit den Ergebnissen von Lairon et al. (100).

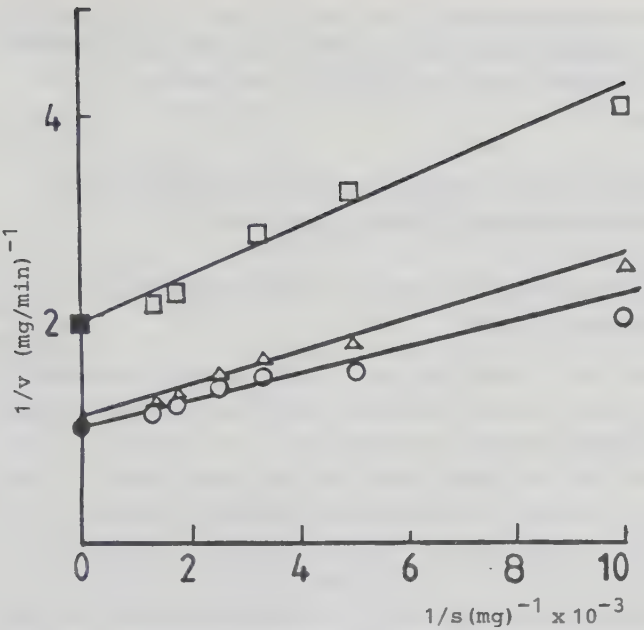

Abb.21: Lineweaver-Burk-Graphik der Lipase-Aktivität verschiedener Pankreatin-Chargen.
Zeichenerklärung: siehe Abb.16

4.3.4.2 Pankreatin verschiedener Hersteller

Die Lineweaver-Burk-Graphik und die Km- und V-max-Werte sind in Abb.21 und Tab.11 aufgeführt. Es ist offensichtlich, daß die Km-Werte von P_1 und P_2 vergleichbar sind, während der Km-Wert von P_3 etwa um 50% höher liegt. Dies kann auf folgendes hindeuten:
Die Komplexbildung mit den ersten beiden Substanzen ist im Vergleich zur letzteren erleichtert, daraus ließe sich die Differenz in den Aktivitäten erklären, wie Abb.15 zeigt. Obwohl P_1 und P_2 gleiche Aktivitäten und Km-Werte zeigen, sind die V-max-Werte unterschiedlich. Dies kann mit der Tatsache zusammenhängen, daß die Pankreatinqualität sowohl von einem Hersteller zum anderen als auch innerhalb der Chargen desselben Herstellers Unterschiede aufweisen kann.

So sind die Ergebnisse der klassischen kinetischen Analyse wertvoll, trotz der Schwierigkeiten, die aus der komplexen Natur des Enzymsystems, besonders in der unreinen Form hervorgehen.

4.3.5 Einfluß der Gallensalze auf die physikalischen Eigenschaften von Pankreatin-Tabletten

4.3.5.1 Gleichförmigkeit des Gewichts, Größe und Oberstempelpreßkraft

Tablettengewicht, Größe und die am Oberstempel gemessene Preßkraft werden als Mittelwerte und Variationskoeffizient von 20 Tabletten in Tab.12 dargestellt. Es wird klar, daß die Kombination der Gallensalze mit Pankreatin-Avicel eine größere Abweichung bei der Gleichförmigkeit der Tabletten zur Folge hat. Bolhuis&Lerk (31) erwähnten, daß die Variationskoeffizienten von Tablettengewicht und Oberstempel-Preßkraft Rückschlüsse auf die Fließfähigkeit des zu verpressenden Materials zulassen könnten. Daher würde bei Anwesenheit von Gallensalzen die Fließfähigkeit der Pankreatin-Avicel-Mischung abnehmen.

4.3.5.2 Mechanische Eigenschaften

Der Einfluß der Gallensalze auf die mechanischen Eigenschaften der Tabletten wurde mit Hilfe des Heberlein-Testers und des Roche-Friabilators geprüft. Die mit Gallensalzen hergestellten Tabletten zeigten schlechte mechanische Eigenschaften, wie aus Tab.12 ersichtlich ist. Die Bruchfestigkeit wurde verringert und der Abrieb erhöht.
Die mechanischen Eigenschaften von Tabletten können besser ausgedrückt werden durch die Kombination von Bruchfestigkeit und Abrieb in einer Gleichung. Man erhält den HFI-Index (Bruchfestigkeit/Abrieb-Index).
Aus Tab.12 wird somit klar, daß die Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin-Avicel bei den Tabletten die HFI-Werte verminderte und damit schlechte mechanische Eigenschaften zur Folge hatte.

Tab.12: Mittelwert und Variationskoeffizienten von Gewicht, Dicke und Oberstempelpreßkraft der Pankreatin-Avicel-Tabletten ohne und mit Gallensalz- Zugabe

Gallensalze	Gewicht		Dicke		Oberstempelkraft	
	M (mg)	% V.K.	M (mm)	% V.K.	M (KN)	%V.K.
-	266	0,75	3,92	0,68	2,40	1,42
Cholat	280	1,05	4,20	0,80	2,42	4,48
Deoxy-Cholat	264	2,27	3,90	1,02	2,37	6,62
Ochsengalle	272	1,28	4,19	0,66	2,32	7,35
Tauro-Cholat	277	2,33	4,12	1,11	2,35	8,00

Tab.13: Mechanische Eigenschaften und Zerfallszeit der Pankreatin-Avicel-Tabletten ohne und mit Gallensalzzugabe

Gallensalze	Bruchfestigkeit (kp)		Friabilität (%)	VBF (%)	Zerfallszeit	
	M	%V.K.	M		M	%V.K.
-	2,75	9,50	0,78	100	8,6	15,8
Cholat	2,50	10,70	1,66	43	11	22,7
Deoxy-Cholat	2,50	11	0,92	77	16,6	17,5
Ochsengalle	2,25	11,42	0,98	65	11,5	24,5
Tauro-Cholat	1,75	13,22	2,15	23	10,6	30,2

4.3.5.3 Zerfallszeit

Die Zerfallszeiten sind in Tab.12 aufgeführt. Die mit Gallensalzen hergestellten Tabletten zeigten längere Zerfallszeiten trotz geringerer Härte. Beobachtete man die Tabletten während des Auflösens, so zeigte sich, daß bei Anwesenheit von Gallensalzen eine pastöse und gallertartige Masse gebildet wurde, die die Tablette einhüllte, wodurch die Zerfallszeit verlängert wurde.
Es ist auch hier erwähnenswert, daß schneller Zerfall der Pankreatin-Tabletten eine optimale Voraussetzung für einen guten Kontakt zwischen Enzym und Substrat ist. Es wird hierdurch klar, daß die Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin-Avicel-Tabletten die Zerfallszeit verzögert und auch danach noch die Wirkstoff-Freigabe behindern kann, wie im folgenden Kapitel diskutiert werden wird.

Kapitel 5 Der Einfluß von Gallensalzen auf Freigabe und Haltbarkeit von Pankreatin-Tabletten

5.1 Einleitung

Die Untersuchung über den Einfluß der Kombination von Gallensalzen mit Pankreatinen auf Lipaseaktivierung und Tabletteneigenschaften wurde mit dem Ziel fortgesetzt, auch die Gallensalzeffekte auf die Lipasefreigabe und -haltbarkeit zu studieren, zumal diese Kombination verbreitet ist.

5.2 Beschreibung der Versuche

5.2.1 Materialien

Pankreatin (Kali-Chemie Pharma, Hannover), die anderen Materialien wurden in Kapitel 4 beschrieben.

5.2.2 Herstellung der Tabletten

Für jedes Gallensalz wurden Tabletten unter zwei Preßkräften hergestellt, nämlich 2,5 und 4 kN. Die nachstehende Rezeptur wurde eingesetzt:

Pankreatin	100 Teile
Avicel 102	100 Teile
Gallensalze	25 Teile
Polyplasdone XL	10%
Mg-Stearat	1%

5.2.3 Stabilität der Lipase in Lösung

Eine wäßrige Pankreatin-Lösung, gelagert bei 25°C und 37°C, wurde auf Lipase-Aktivität in bestimmten Zeitintervallen bestimmt. Dieser Versuch wurde mit dem Ziel, die geeignete Temperatur für die Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit zu wählen, geführt.

5.2.4 Auflösungsgeschwindigkeit

5.2.4.1 Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin-Tabletten

Die Bestimmung der Lipasefreigabe wurde nach der USP XX (Apparatur 2) bei 100 Upm und 25°C durchgeführt. In bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und die Lipase-Aktivität nach der FIP-Methode bestimmt.

5.2.4.2 Gallensalze in der Prüfflüssigkeit

Deoxycholat- und Taurocholat-Lösungen in Konzentrationen von 0,02, 0,05 und 0,1% wurden als Prüfflüssigkeit verwendet. Die Lipasefreigabe wurde wie oben beschrieben bestimmt.

5.2.4.3 Die Gleichgewichtslöslichkeit

250 mg Pankreatin wurden in je 5 ml Puffer pH 6,8 oder Deoxycholat- oder Taurocholat-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen suspendiert. Die Suspensionen wurden in einem Eisbad eine Stunde lang geschüttelt. Die Lipasegehaltsbestimmung der Lösung erfolgte nach der FIP-Methode, nachdem die Suspension bei 2000 Upm 5 Minuten lang zentrifugiert worden war.

5.2.4.4 Die Micellar-Interaktion durch die Molekülsiebmethode

Die Methode von Ashwarth und Heard (105) wurde wie folgt angewandt: zu 15 ml Wasser wurden 4 g Sephadex G-25 hinzugegeben und 2 Stunden quellen gelassen, 5 ml Puffer pH 6,8 oder Deoxycholat oder Taurocholat (in Puffer pH 6,8) wurde zugefügt, anschließend 5 ml filtrierte Pankreatin-Lösung. Durch 1 Stunde Schütteln im Eisbad konnte sich in dem System ein Gleichgewicht einstellen. Von der klaren überstehenden Lösung wurde die Lipase-Aktivität bestimmt. Die relative Interaktion wurde als das Verhältnis der Lipase-Aktivitäten mit und ohne Gallensalze berechnet.

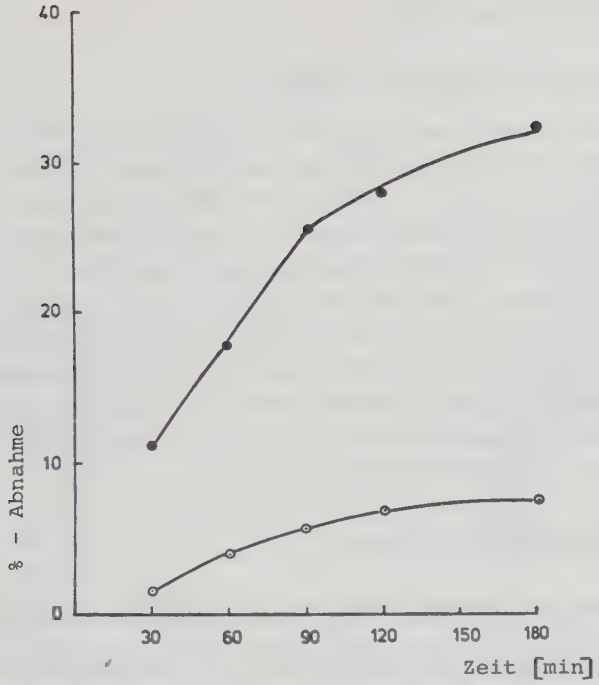

Abb.22: Abnahme der Lipase-Aktivität in wäßiger Lösung

● = bei 37°C; O = bei 25°C

5.2.5 Stabilitätsstudie

Von den mit 4 kN hergestellten Pankreatin Tabletten wurden Proben in einem dicht verschlossenen Glasbehälter bei 37°C ein Jahr lang gelagert. Die Lipase-Aktivität wurde vor und gleich nach der Tablettierung, sowie in bestimmten Zeiträumen bestimmt.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Stabilität der Lipase in Lösung

Abb.22 zeigt die prozentualen Lipase-Verluste in den wäßrigen Lösungen bei 25 und 37°C. Es wird deutlich, daß Lipase bei 25°C stabiler als bei 37°C ist. So wurde entschieden, die Bestimmung der Auflösungsgeschwindigkeit bei Raumtemperatur mit dem Ziel der Enzymverlustverminderung durchzuführen. Raumtemperatur kann für vergleichbare Auflösungsstudien geeignet sein (106, 107, 108). Einige Handelspräparate von Pankreatin wurden auf Lipasefreigabe bei 37°C untersucht (44), obwohl die mögliche Lipasezersetzung während der Auflösungsperiode nicht berücksichtigt wurde, was die geringeren Freigabewerte erklären könnte.

5.3.2 Auflösungsgeschwindigkeit

5.3.2.1 Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin-Tabletten

Abb.23 zeigt die Wikrung der Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin-Avicel-Tabletten bei 2,5 und 4 kN auf die Lipasefreigabe. Es ist deutlich, daß die Lipasefreigabe durch Gallensalzzusätze in der Reihenfolge: Taurocholat > Ochsengalle > Cholat > Deoxycholat vermindert wurde.
Ähnlich zeigen auch mit Gallensalzen hergestellte Tabletten längere Zerfallszeiten durch die Bildung einer pastösen und gallertartigen Masse, welche die Tabletten einhüllt. Dasselbe geschieht möglicherweise auch bei Auflösungsuntersuchungen, wo ebenfalls die Freigabe verzögert ist. Bei Erhöhung der Preßkraft von 2,5 auf 4 kN nimmt die Lipasefreigabe ab. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Graf et al. (86) überein.
Für eine schnelle Freigabe ist es notwendig, daß das Lösungsmedium schnell und gleichmäßig durch das Porennetz eindringt, um die Bindungskräfte in der Tablette zu überwinden. Bei der Saugfähigkeituntersuchung zeigt sich eine kleine anfängliche Wasseraufnahme, die nach kurzer Zeit (0,5 min) zum Stillstand kommt.

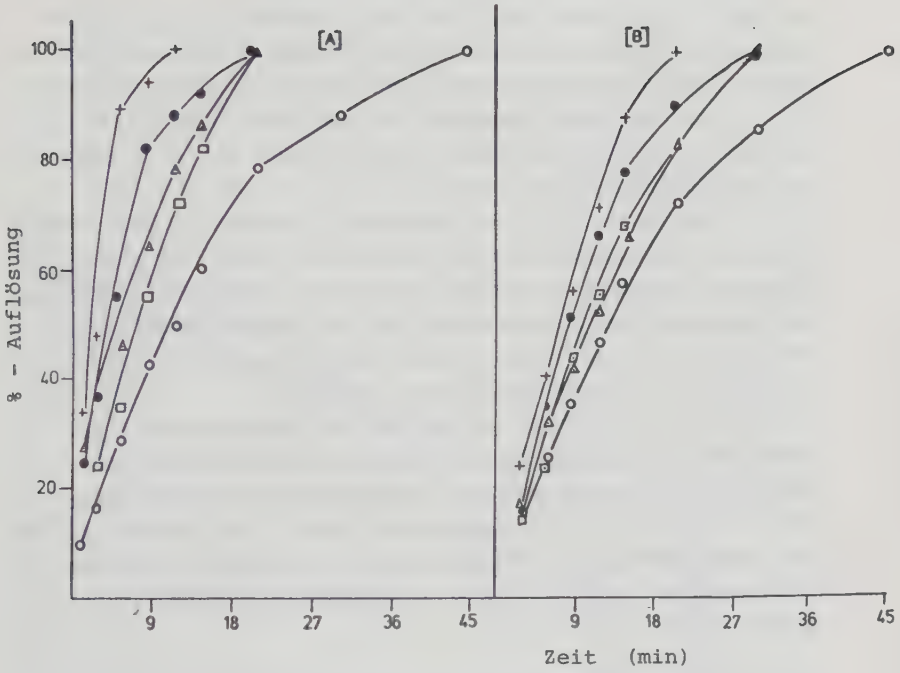

Abb.23: Einfluß der Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin-Tabletten auf die Lipasefreigabe
A = 2,5 KN; B = 4 KN
Zeichenerklärung: siehe Abb.20

Sind in der Tablette Gallensalze vorhanden, sinkt die anfängliche Wasseraufnahme auf die Hälfte ab.

5.3.2.2 Gallensalze in der Prüfflüssigkeit

Aus Abb.24 wird deutlich, daß die Anwesenheit von Gallensalzen in der Prüfflüssigkeit die Lipasefreisetzung fördert. Deoxycholat ist wirksamer als Taurocholat. Um den Mechanismus der Gallensalzwirkung auf die Lipasefreigabe aufzuklären, wurde die Micellen-Interaktion durch die Molekülsiebmethode untersucht (105).
Wie in Abb.25 ersichtlich, vermehren Deoxycholat und Taurocholat die Lipaselöslichkeit in Wasser, wobei das erste wirksamer als das zweite ist. Doch zeigen beide eine kleine und ähnliche Micellen-Interaktion. Das kann darauf hinweisen, daß Lipase mit den Gallensalzen einen Micellenkomplex in einem geringeren Maße bildet (109).
Wahrscheinlich ist die Steigerung der Auflösungsrate in Anwesenheit von Gallensalzen durch die Herabsetzung der Oberflächenspannung zwischen Prüfsubstanz und Auflösungsmedium bedingt. Diese Wirkung wird durch die Zunahme der Lipaselöslichkeit und -freigabe auch bei geringer Gallensalzkonzentration unterhalb der kritischen Micellenkonzentration unterstützt.

5.3.2.4 Auflösungsgeschwindigkeitskonstante

Es gibt mehrere Methoden in der Literatur für die Berechnung der Auflösungsdaten (110-116). Die in Abb.26 und 27 dargestellten Freigabewerte entsprechen einer Reaktion 1.Ordnung. Die Übereinstimmung mit der Reaktionsordnung zeigt sich in der Annäherung der Korrelationskoeffizienten an 1. Die Auflösungsgeschwindigkeitskonstanten wurden berechnet und in Abb.26 graphisch dargestellt.
Aus Abb.28 geht hervor, daß die Auflösungsgeschwindigkeitskonstanten durch die Anwesenheit von Gallensalzen in der Prüfflüssigkeit -auch in geringer Konzentration- erhöht werden. Dagegen wird die Konstante durch die Einarbeitung von Gallensalzen in Pankreatin-Avicel-Tabletten um mehr als 50% vermindert.

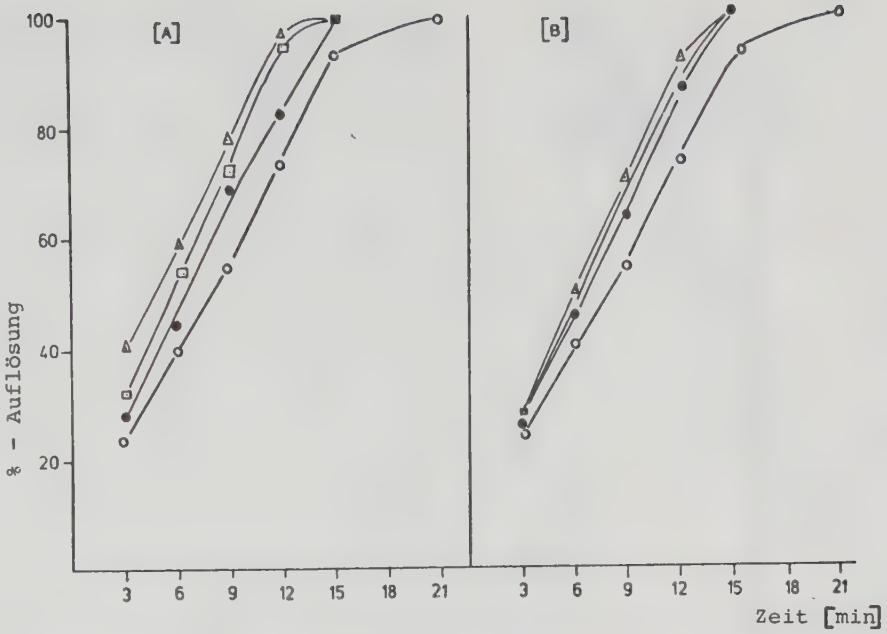

Abb.24: Einfluß der Anwesenheit von Gallensalzen in der Prüfflüssigkeit auf die Lipasefreisetzung.

A = Deoxycholat, B = Taurocholat

△ = 0,1%, □ = 0,05%, ● = 0,02% O = 0%.

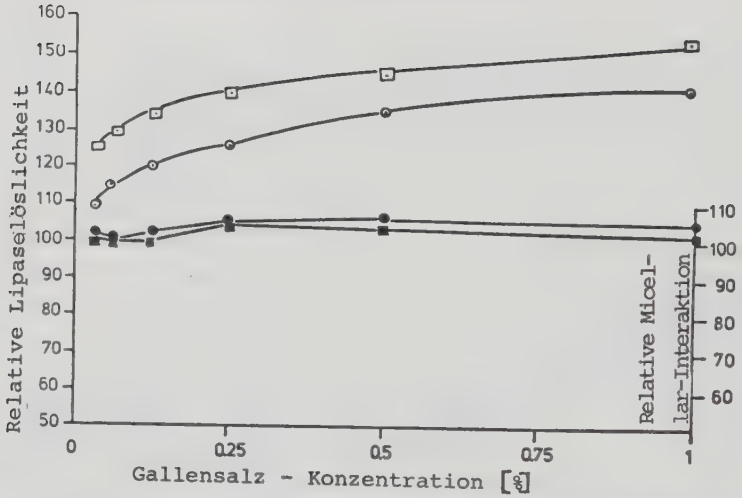

Abb.25: Relative Lipaselöslichkeit (offene Symbole) und relative Micellar-Interaktion (geschlossene Symbole).

□ = Taurocholat, O = Deoxycholat

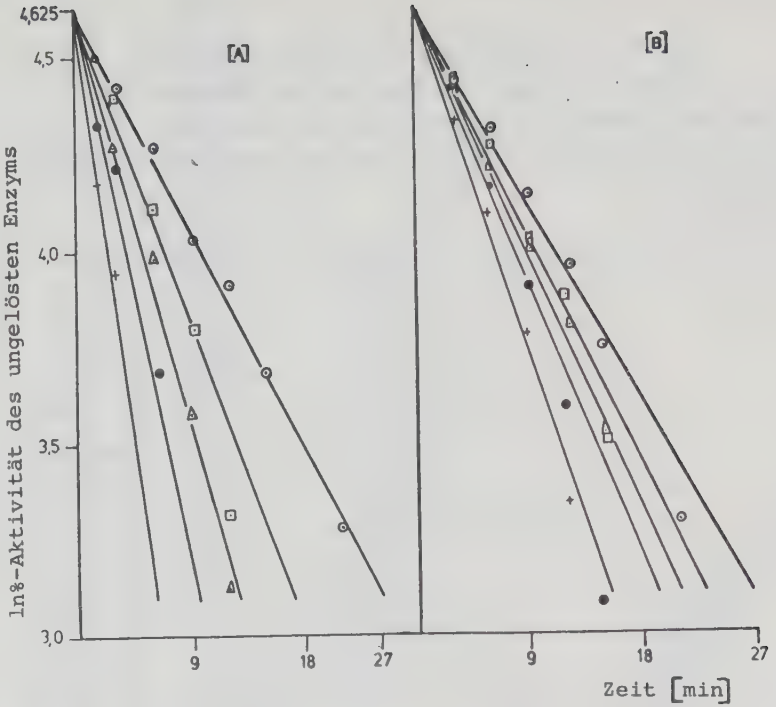

Abb.26: Graphische Darstellung: ln% ungelöste Lipase aus den verschiedenen Tabletten gegen die Zeit
Zeichenerklärung: siehe Abb.23

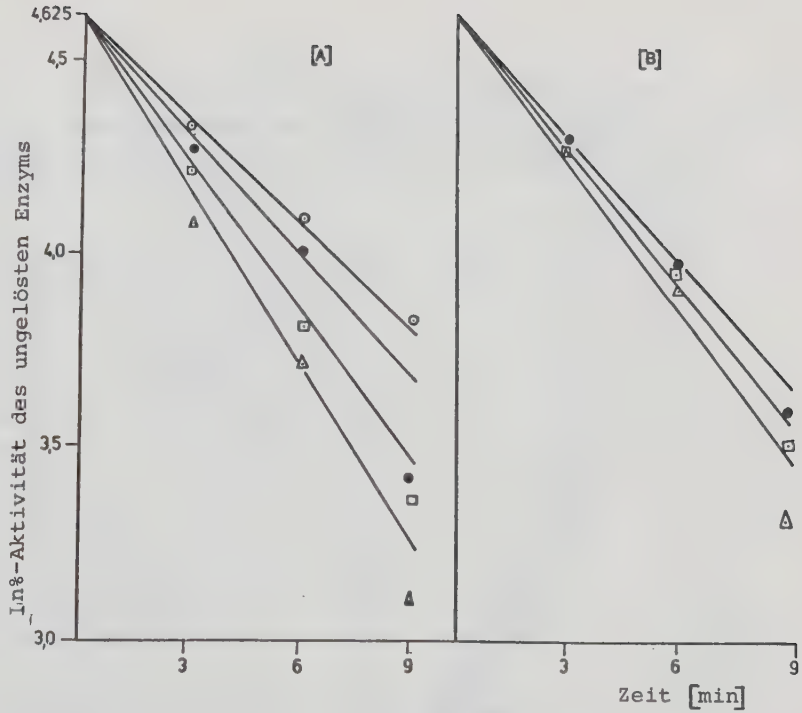

Abb.27: Graphische Darstellung: ln% ungelöste Lipase aus Pankreatin-Avicel-Tabletten in Deoxycholat-und Taurocholat-Lösungen als Prüfflüssigkeit. Zeichenerklärung: siehe Abb.24

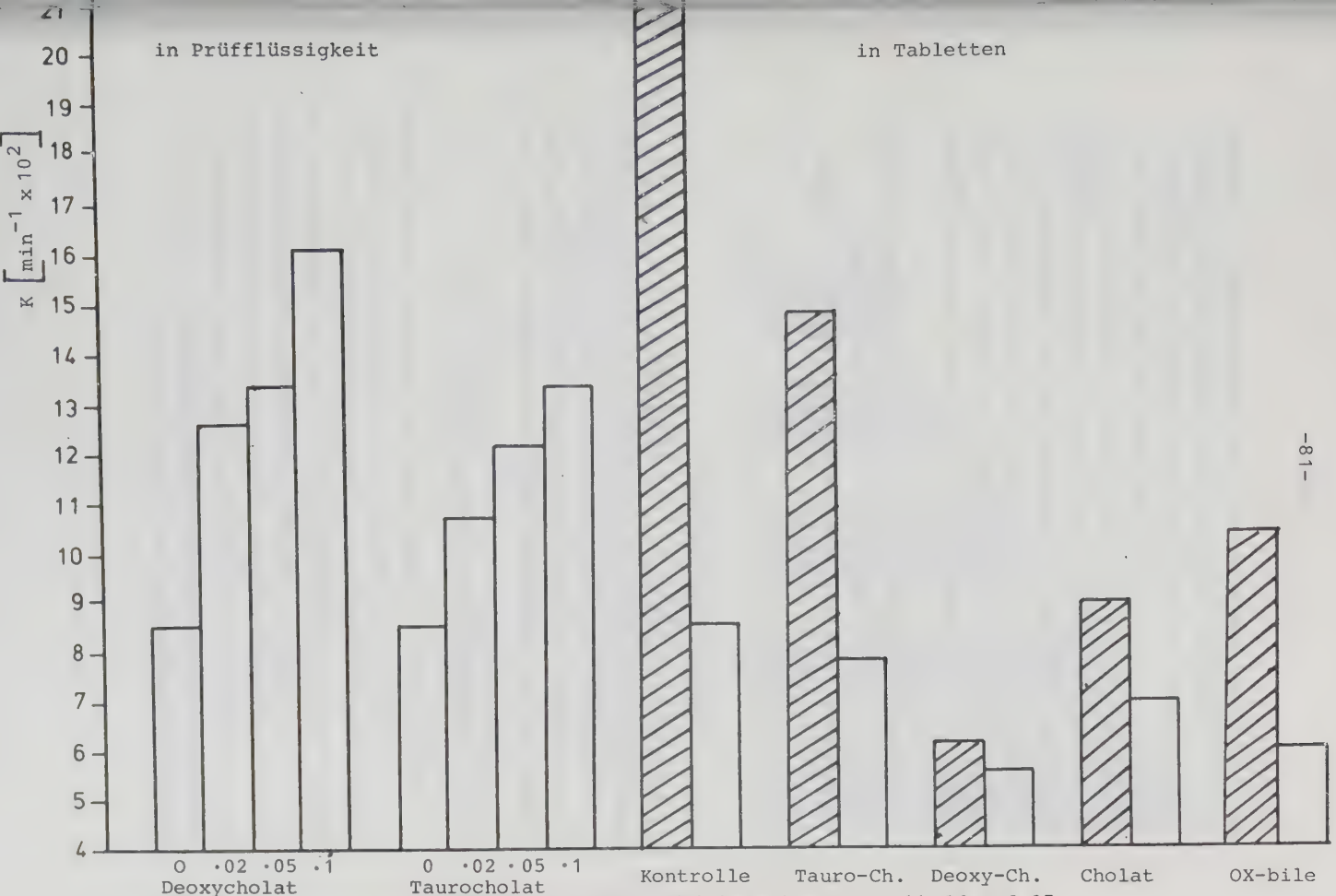

Abb.28: Auflösungsgeschwindigkeitskonstanten (K) berechnet aus Abb.26 und 27

▨ = 2,5 KN; □ = 4 KN

Der Einfluß der Preßkraft auf die Enzymfreigabe zeigt sich deutlich, besonders bei Pankreatin-Tabletten ohne Zusätze, wo die Abnahme der Auflösungskonstantenbei Erhöhung der Preßkraft von 2,5 auf 4 kN mehr als 50% ist. So kann die Teilchenbindung die vorherrschende Erscheinung während der Kompression sein (117), deshalb nahm die Auflösungsgeschwindigkeit bei Erhöhung der Preßkraft ab. Die Anwesenheit von Gallensalzen kann sich auf die Bindungseigenschaften der Pankreatin-Avicel-Tabletten auswirken, woraus sich schlechtere Freigabe und verminderte mechanische Festigkeit ergeben.
In Pankreatin-Tabletten wird die Auflösungsgeschwindigkeitskonstante durch Gallenzusätze in der Reihenfolge:
Taurocholat > Ochsengalle > Cholat > Deoxycholat gesenkt.

5.3.3 Stabilität

5.3.3.1 Effekt der Kompression

Die Lipasebestimmung bald nach Tablettierung hat gezeigt, daß Lipaseverluste bei der Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin-Avicel-Tabletten beim Pressen vernachlässigbar sind, da ein Verlust von 5% bei solch empfindlichen biologischen Wirkstoffen wie Pankreatin als normal angesehen werden kann.

5.3.3.2 Enzymstabilität nach Lagerung bei 37°C

Die Lipase-Aktivität wurde durch die Kombination von Gallensalzen mit Pankreatin-Tabletten beim Lagern bei 37°C signifikant gehemmt. Abb.29 zeigt, daß die Verluste bei Taurocholat, Cholat und Ochsengalle höher als bei Deoxycholat sind. Hier ist zu erwähnen, daß die erheblichen Enzymaktivitätsverluste nicht gleich nach der Tablettierung beobachtet wurden. Das kann vermutlich das Resultat einer Zeit erfordernden Wechselwirkung zwischen den Hydroxygruppen der Gallensalze und den Carboxylgruppen des Enzyms sein (50).

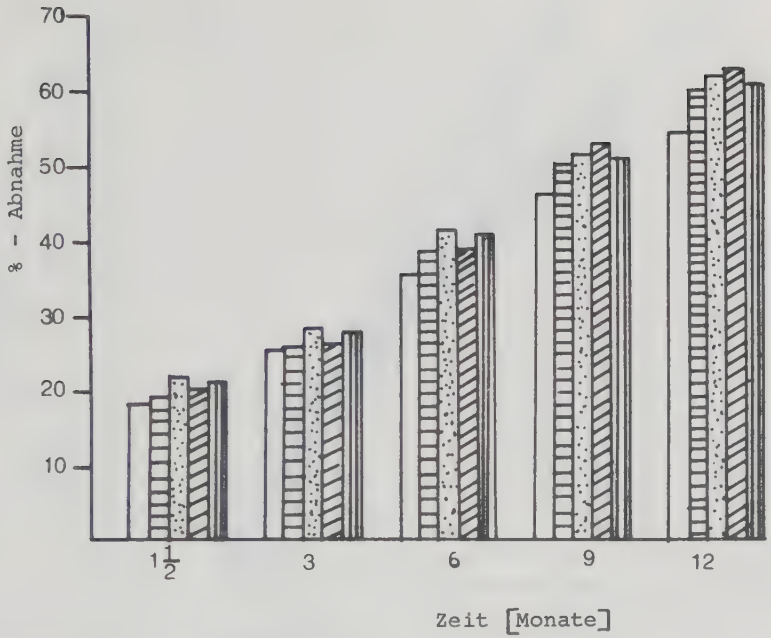

Abb.29: Einfluß der Gallensalze auf Lipase-Stabilität der Pankreatin-Avicel-Tabletten bei Lagerung bei 37°C.

□ = Kontrolle; ▤ = Deoxycholat;

⁘ = Taurocholat; ▨ = Cholat; ▥ = Ochsengalle

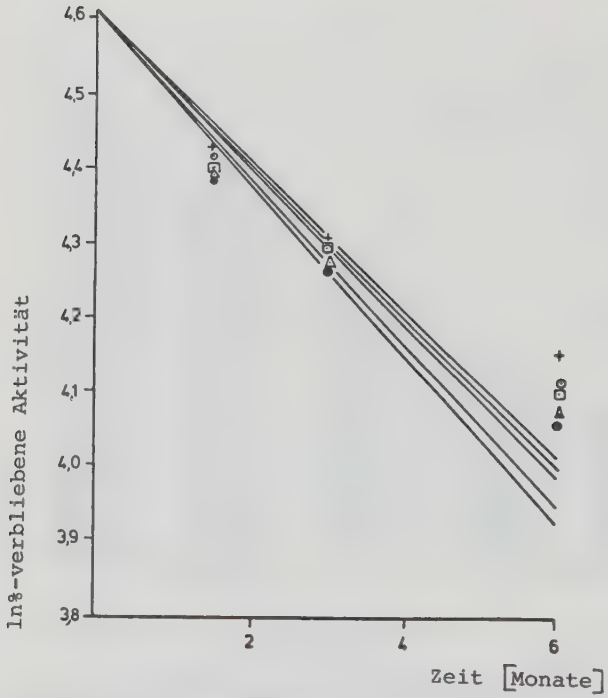

Abb.30: Thermischer Abbau der Kontroll-Tabletten und der Gallensalze enthaltenden Pankreatin-Tabletten
(Gerade 1.Ordnung)
Zeichenerklärung siehe Abb.20

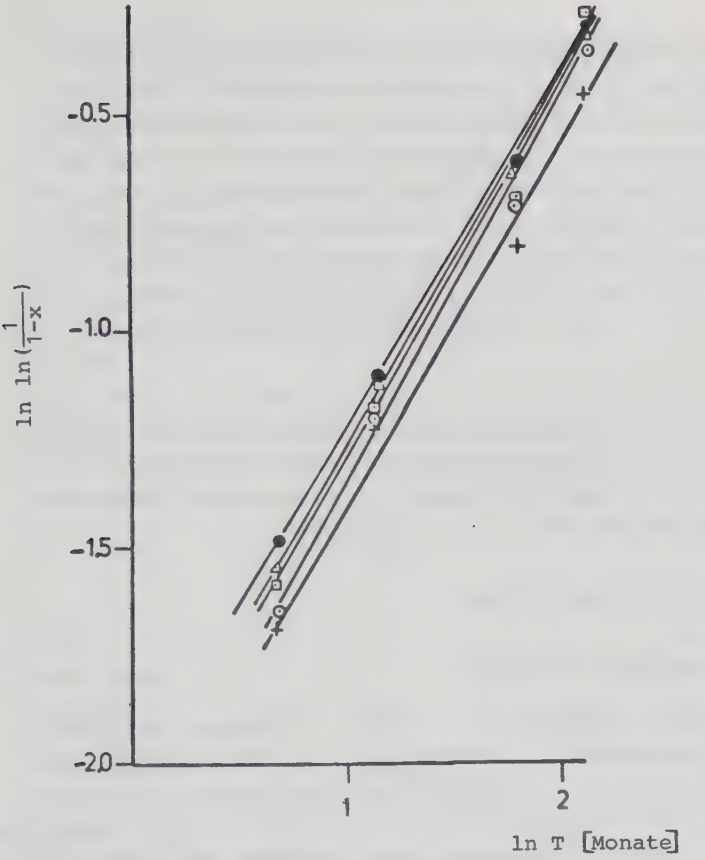

Abb.31: Gerade der Weibull-Verteilungsfunktion für den thermischen Abbau der Kontroll-Tabletten und der Gallensalze enthaltenden Pankreatin-Tabletten. Zeichenerklärung: siehe Abb.20

Anders als verschiedene synthetische Wirkstoffe ist jedes Enzym nur in einer bestimmten dreidimensionalen Konformation stabil und aktiv. Diese native Konformation wird durch Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren-Ketten und anderen Wirkstoffen oder Hilfsstoffen beeinflußt. Graf und Mitarbeiter (16, 50, 84, 86) beobachteten hemmende Interaktionen zwischen den Pankreasenzymen und einigen Hilfsstoffen. Auch wurde ein Verlust von 50% der proteolytischen Aktivität des Pankreatins durch 5 mg Zimtpulver festgestellt (87).
Weil die Enzymaktivität ein komplexes Gebiet ist, das durch Kombination mit anderen Wirkstoffen problematischer wird, empfehle ich, Pankreatin-Präparate ohne Zusätze von Gallensalzen oder anderen Wirkstoffen zu verabreichen, wenn nicht eine Stabilitätsstudie durchgeführt wurde.

5.3.3.3 Kinetische Studie

5.3.3.3.1 Reaktionskinetik

Die graphische Darstellung der Stabilitätsdaten weist auf eine Reaktionskinetik 1.Ordnung hin, wie Abb.30 zeigt. Die Übereinstimmung mit der Reaktionsordnung zeigt sich in der Annäherung der Korrelationskoeffizienten an 1. Die Zersetzungskonstante (k) jeder Rezeptur wurde berechnet und in Tab.13 aufgeführt.

5.3.3.3.2 Weibull-Verteilungsfunktion

Die Stabilitätsdaten wurden mit der Weibull-Verteilungsfunktion verglichen (118). Abb.31 zeigt die Geraden, die bei der Darstellung von $\ln \ln(\frac{1}{1-x})$ gegen $\ln T$ erhalten werden.
Der Wert 1/mlnk wurde berechnet und in Tab.13 aufgeführt.

5.3.3.3.3 Vergleich der Reaktionskinetik mit der Weibull-Funktion

In dieser Studie wurden die Stabilitätsdaten kinetisch untersucht. Zuerst ergab sich eine Reaktionskinetik 1.Ordnung. Jedoch wurde nach Vergleich mit der Weibull-Funktion eine bessere Übereinstimmung gefunden, wie der oben angeführte mittlere Korrelationskoeffizient zeigt. Wie früher berichtet (119), macht die Anwendung der Weilbull-Funktion die Bestimmung der Reaktionsordnung überflüssig.

Tab.14: 1.Ordnung Abbau-Konstanten (k) und der Weibull-Parameter (1/m ln k) bei 37°C für die Lipase

Gallensalze	$k^{a)}$	- 1/m ln k
-	66,3	2.91
Cholat	79,9	2,67
Deoxycholat	74,7	2,73
Ochsengalle	76,8	2,69
Taurocholat	77,3	2,70

a) $(\text{Monat}^{-1} \times 10^{3})$

Experimenteller Teil

1. Bestimmung der Pankreasenzyme

1.1 Amylasebestimmung

Für die Bestimmung ist eine große Anzahl von Methoden genannt worden. Sie richten sich nach der Herkunft der Substanz, ihrer Reinheit und der Art der Begleitstoffe. In dieser Arbeit erfolgt die Bestimmung nephelometrisch.

A. Prinzip der Methode

Die Abnahme der Trübung einer Amylopektin-Suspension unter der Einwirkung von Amylase wird mit dem kinetisch messenden Nephelometer (Modell 91, Firma Perkin-Elmer) verfolgt (119).

B. Definition der Einheit

Eine Einheit entspricht der Enzymmenge, die unter den Bedingungen des Analysenverfahrens glykosidische Bindungen spaltet, die der reduzierenden Wirkung von 1 mg Glucose äquivalent sind (120).

C. Reagenzien

I) Tris-Puffer (pH 7,2)
Wird von der Firma Perkin-Elmer in Gläschen geliefert, pro Gläschen 1,13 g Tris-HCl (pH 7,2), 0,11 g Natriumchlorid und 0,075 g Natriumazid.
II) Amylasesubstrat
Jedes gelieferte Gläschen enthält 0,6 g Amylopektin, gelöst in Dimethylsulfoxid in Form eines Gels.

D. Herstellung der Substratlösung

75 ml dest. Wasser im Meßzylinder abmessen. Ca. 15 ml davon in ein Gläschen mit Amylasepuffer geben, verschließen und

Trockensubstanz durch Schütteln lösen. Dieses Pufferkonzentrat in ein Gläschen Amylasesubstrat gießen, wieder verschließen und Substrat-Gel durch heftiges Schütteln im Puffer lösen. Das jetzt trübe Gemisch in einen 150 ml Erlenmeyerkolben gießen und Substrat-Gel mit weiteren Wasser-Aliquoten durch gutes Schütteln quantitativ in einen Kolben spülen, bis die Gesamtmenge von 75 ml Wasser verbraucht ist. Erlenmeyerkolben mit Parafilm abdecken und so lange schütteln, bis eine gleichförmige Suspension erreicht ist. Die Suspension auf siedendem Wasserbad 10 min lang erhitzen. Nach dem Abkühlen ist die Amylasesubstrat-Lösung gebrauchsfertig.

+) Prüfung der Substrat-Lösung

Vor Gebrauch Trübungsgrad des Substrates am Analysator prüfen. Bei Einstellung des Gerätes mit dem mitgelieferten Nephelos-Standard auf 50 Nephelos-Einheiten soll die gebrauchsfertige Substratlösung einen Nephelos-Wert zwischen 50 und 70 aufweisen. Diese Prüfung soll zwischendurch wiederholt werden, um die Richtigkeit der Messung zu sichern.

+) Haltbarkeit der Lösung

Die Substratlösung ist im Kühlschrank (+4°C, nicht einfrieren) eine Woche haltbar, bei Zimmertemperatur oder im Inkubator des Modells 91 (bei 37°C) max. 24 Stunden haltbar.

E. Messung

I) Herstellung der Probe

Für die Bestimmung der Amylaseaktivität in Tabletten werden 5 Tabletten zufällig ausgewählt und in einem Mörser fein zerrieben. Eine Menge, die etwa 15-50 mg Pankreatin enthält, wird in einen 100 ml Kolben genau gewogen. Dazu werden 100 ml bereits abgekühltes Wasser gegeben. Der Kolben wird anschließend in ein Eisbad gebracht und 30 min lang mit einem Magnetrührer gerührt. Danach wird die Enzymsuspension durch eine Glasfritte G3 (Schott, D-Mainz) filtriert. Aus dem Filtrat werden 10 ml entnommen und mit 90 ml kaltem demin. Wasser

verdünnt, die Enzymaktivität wird dann 2-3 mal gemessen. Das ganze Verfahren wird 3-5 mal wiederholt, um den Mittelwert der Aktivität zu bestimmen.

II) 3 ml gebrauchsfertige Amylasessubstrat-Lösung werden in eine saubere Pyrexküvette mit Hilfe eines Pipettierballs pipettiert.

III) Die gefüllte Küvette mit Deckel wird mindestens 20 min im Inkubator des Gerätes vortemperiert.

IV) Reaktion durch Hinzupipettieren von 50 µl Probe starten.

V) Die Küvette wird mit Parafilm verschlossen und durch mehrmaliges Neigen gemischt (nicht schütteln).

VI) Die Küvette wird sofort in Meßposition gesetzt und mit dem Deckel verschlossen. Der kinetische Meßvorgang läuft jetzt automatisch ab.

VII) Meßvorgang ist beendet, wenn Cycle-Lampe blinkt.

VIII) Meßwert ist während der nächsten 30 min ablesbar.

D. Umrechnung der Aktivität

In dieser Arbeit wurde die Enzymaktivität in F.I.P.-Einheiten die z.Z. am häufigsten verwendet werden, angegeben. Daher ist die Umrechnung der Einheiten des Analysators notwendig. Dazu wurde Standard-Pankreatin (Nordmark-Werke, D-Hamburg) mit bekannter Zahl F.I.P-Einheiten als Vergleichssubstanz eingesetzt und eine Umrechnungstabelle erstellt. Bei Darstellung der gemessenen Analysator-Aktivitäten (Somogyi-Einheiten) gegenüber den Sollwerten der Lösungen in F.I.P.-Einheiten erhält man eine Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99, wie in Abb.32 gezeigt.

1.2 Lipasebestimmung

1.2.1 F.I.P.-Methode (121)

A. Prinzip der Methode

Hydrolyse der Triglyceride von Olivenöl, bestimmt durch Titration der freigesetzten Carbonsäure bei pH 9,0.

B. Definition der Einheit

1 Einheit ist die Enzymmenge, die unter den Testbedingungen bei pH 9,0 und einer Temperatur von 37°C pro Minute ein Mikroäquivalent Säure freisetzt.

C. Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind von E. Merck, D-Darmstadt.

I) Gummi arabicum: 10%ige Lösung
100 g Gummi arabicum werden in 1 Liter Wasser gelöst. Dazu wird 2 Stunden lang mit einem Glasflügel-Rührer gerührt, dann wird die Lösung bei 5000 U/min 30 min lang zentrifugiert. Die klare Lösung wird danach gesammelt und in einem Gefrierfach bei -20°C aufbewahrt.

II) Olivenöl

III) Natriumtaurocholat (F.I.P. controlled-Qualität)
8%ige Lösung in Wasser, die Lösung muß frisch am Tag der Messung hergestellt werden.

IV) Natronlauge: 0,1N

V) Pufferlösung
60,6 mg Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und 234 mg Natriumchlorid werden in Wasser zu 100 ml gelöst. Im Kühlschrank ist die Lösung 3 Tage lang haltbar.

VI) Lipase-Lösungsmittel:
10 g Natriumchlorid, 6,06 g Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan und 4,9 g Maleinanhydrid werden in 900 ml Wasser gelöst. 4N-Natronlauge wird dazugegeben, bis pH 7,0 erreicht ist, dann wird auf 1 Liter aufgefüllt. Im Kühlschrank ist die Lösung für 3 Tage brauchbar.

VII) Standard-Pankreatin: (F.I.P. controlled-Qualität)

VIII) Vorratsemulsion (15):
Mit Hilfe des Ultra-Turrax T45/N (OKA-Werk, D-Staufen im Breisgau) werden 40 ml Olivenöl, 330 ml Gummilösung und 30 ml Wasser in einem 1-Liter Becherglas (9 cm Durchmesser) 30 min lang emulgiert. Der Homogenisator ist während des Emulgierens ca. 1 cm vom Boden des Becherglases entfernt. Um hydrolytische Wirkung der beim Rühren entstehenden Wärme möglichst auszuschließen, wird das Becherglas in eine Kältemischung aus Ethanol und Trockeneis gestellt. Dann wird zuerst auf 1000-2000 U/min gehalten, bis die Temperatur der zu emulgierenden Mischung auf 5-10°C sinkt, anschließend wird die Drehzahl für 30 min auf ca. 10 000 U/min erhöht. Die Temperatur muß durch periodische Zugabe von Trockeneis unter 25°C gehalten werden. 90% der Öltröpfchen müssen einen Durchmesser von weniger als 3 µm und keines einen größeren als 10 µm zeigen. Die Emulsion ist bis 14 Tage nach der Herstellung verwendbar, wenn sie im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt wird.

C. Herstellung der Enzymsuspension bzw. -lösung

Eine Menge, entsprechend ca. 5000 F.I.P.-Einheiten, vom Standard-Pankreatin bzw. von den zerriebenen Pankreatin-Tabletten wird in einem kalten Mörser mit ca. 1 ml kaltem Lipase-Lösungsmittel gut zerkleinert. Durch mehrmaliges Ausspülen mit dem kalten Lipase-Lösungsmittel wird die Suspension zuerst verdünnt und hinterher in einen 200 ml Meßkolben überführt. Diese feine Suspension wird während der Lipasebestimmung in ein Eis-Wasser-Gemisch gestellt. Für die Bestimmung

werden 0,5 ml (≙ ca. 12 F.I.P.-Einheiten) mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette entnommen.

D. Analyse

Die freiwerdenden Fettsäuren werden mit Hilfe eines Kombi-Titrators E 415, E 473 und E 603 (Metrohm, D-Filderstadt) während der Analysenzeit automatisch neutralisiert. Ein thermostatiertes Wasserbad mit einer Zirkulationspumpe (Lauda, Deutschland) wird angeschlossen und die Temperatur des Wasserbades so eingestellt, daß die Temperatur des Substrates im Inkubationsgefäß 37°C erreicht. Von der Substratemulsion werden 29,5 ml in einem Meßzylinder abgemessen, im Wasserbad von 37°C vortemperiert und schließlich ins Inkubationsgefäß überführt. Der pH-Wert des Substrates wird zuerst mit 0,1N-Natronlauge auf 9,0 eingestellt; hinterher werden 0,5 ml Enzymlösung zugegeben; gleichzeitig wird ein Chronometer in Betrieb gesetzt. Die freiwerdenden Fettsäuren werden mit 0,1N-Natronlauge kontinuierlich bis pH 9,0 neutralisiert; der Verbrauch pro min. während der nächsten 5 min wird abgelesen. Der Mittelwert der letzten 4 min wird berechnet. Das ganze Verfahren wird bei dem Standard und bei der Probe 3 bzw. 4 mal wiederholt.

E. Berechnung

Die Lipaseaktivität wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{M \cdot Gs}{S \cdot Gm} \cdot \text{ref.St.} = \text{F.I.P.-Einheiten/mg}$$

wobei:

M = Mittelwert ml verbrauchter 0,1N-Natronlauge bei der Probe
S = Mittelwert ml verbrauchter 0,1N-Natronlauge beim Standard
Gs = Gewogene Menge Standard (mg)
Gm = Gewogene Menge Probe (mg)
ref.St. = Aktivität des Pankreatin-Standards in F.I.P.-Einheiten.

1.2.2 Nephelometrische Methode

A. Prinzip

Die Abnahme der Trübung einer Olivenöl-Suspension unter der Einwirkung der Lipase wird mit dem kinetisch messenden Nephelometer (Modell 91, Firma Perkin-Elmer) über 3 min verfolgt (122).

B. Definition der Einheit

Die Lipaseaktivitätswerte, die mit dem Modell 91 gemessen werden, entsprechen den titrimetrischen Cherry-Crandall-Einheiten, welche das verbrauchte Volumen in ml von N/20 NaOH bei der Neutralisation der freiwerdenden Fettsäuren angeben (123).

C. Reagenzien

I) Lipase-Puffer (pH 9,0)
Wird von Firma Perkin-Elmer in Gläschen geliefert; jedes enthält: 0,19 g Tris-HCl (pH 9,0), 0,11 g Natriumdeoxycholat (Emulgator) und 0,01 g Sorbinsäure (Konservierungsmittel).

II) Lipase-Substrat
Wird auch in Fläschen, die 10 ml 0,8% gereinigtes Olivenöl in denaturiertem Ethanol enthalten, von der Firma Perkin-Elmer verkauft.

+) Herstellung der Substratemulsion
Der Inhalt eines Lipase-Puffer-Gläschens wird in 25 ml dest. Wasser gelöst. Die Pufferlösung wird in einen 50 ml Erlenmeyerkolben gegeben, das Puffer-Gläschen mehrfach nachgespült. 0,5 ml Lipase-Substrat (ethanolische Olivenöllösung) werden mit einer Eppendorf-Pipette aufgesaugt und unter Umschwenken langsam in die Pufferlösung einfließen lassen. Die Pipettenspitze muß während des Einfließenlassens dauernd unter dem Flüssigkeitsspiegel gehalten werden. Nach weiteren 20 sec. Umschwenken ist das Substrat gebrauchsfertig. Durch Vervielfachen der angegebenen Mengen können auch größere Ansätze an Lipase-Substrat hergestellt werden.

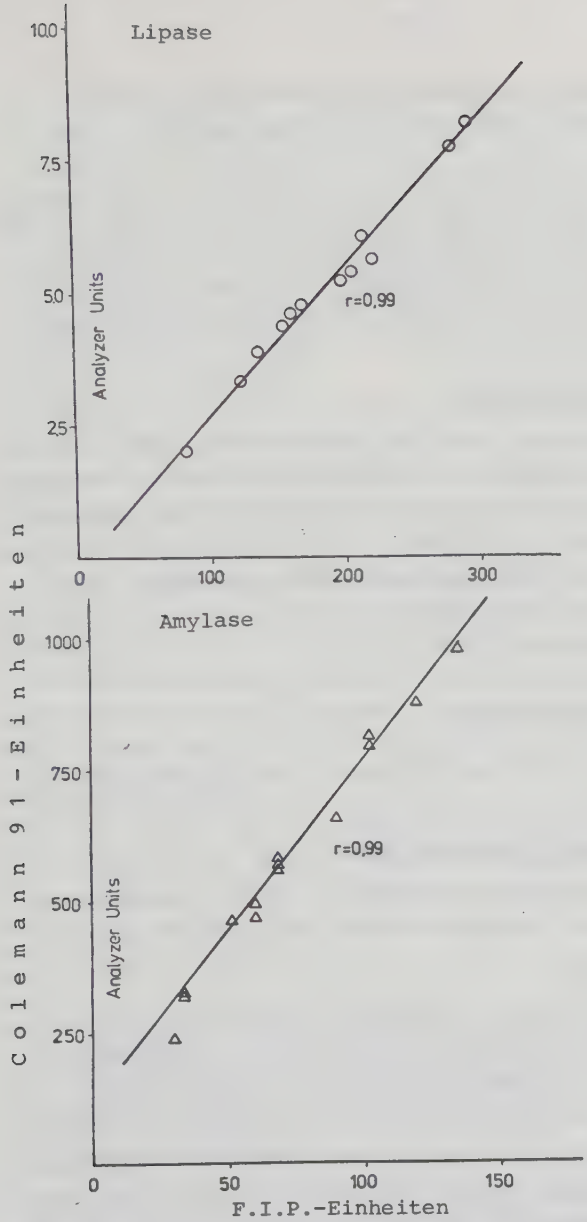

Abb.32: Korrelation zwischen den F.I.P.-Einheiten und den Coleman 91 Amylase-Lipase-Analysator-Einheiten.

Das vorschriftsmäßig hergestellte Substrat ist im Kühlschrank (4°C, nicht einfrieren) eine Woche haltbar.

C. Messung

Dieselbe Lösung, die für die Amylasebestimmung benutzt wurde, kann auch, wenn die Enzymlösung in Eis gehalten wird, anschließend für die Lipasebestimmung eingesetzt werden. Der Meßvorgang ist der gleiche, wie bei der Amylasebestimmung beschrieben wurde.

D. Umrechnung der Aktivität

Um die Lipaseaktivität in F.I.P.-Einheiten angeben zu können, wird eine Umrechnungstabelle erstellt. Dafür werden steigende Konzentrationen eines Standard-Pankreatins mit bekannten F.I.P.-Einheiten auf dem Coleman Modell 91 gemessen (s. unter Amylasebestimmung). Die Relation zwischen den beiden Einheiten ist, wie in Abb.32 gezeigt, linear mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99.

2. Herstellung der Tabletten

In dieser Arbeit wurden die Tabletten durch Direkttablettierung hergestellt.

A. Vorbereitung des Pulvergemisches

Die einzelnen Komponenten der Rezeptur wurden im Turbula-Mischer (Bachhofen, CH-Basel) 10 min lang gemischt.

B. Tablettenpressen

Die Tablettierung erfolgte auf einer instrumentierten Korsch EKO Exzentermaschine (Korsch, D-Berlin) mit Dehnungsmeßstreifen an Ober- und Unterstempel. Als Stempel wurden in der Studie normalerweise Planstempel oder ausnahmsweise Konkavstempel -für die Herstellung der Tabletten zur Filmdragierung- benutzt. Die Instrumentierung umfaßte je 1 DMS-Vollbrücke 3/120 xy 11 (Empfindlichkeit 1 kp=0,985 /um/m = 0,4925 /uV/V) auf den Stempelkolben sowie einen induktiven Weggeber W50k (Höttinger-Baldwin, D-Darmstadt).

Der Meßteil enthielt 3 Trägerfrequenz-Meßbrücken Philips PR 9307 (Philips, D-Stuttgart).
Schreiber: x/t: Philips PM 8222, Basisempfindlichkeit 10 mv, Einstellzeit 0,25 s.f.d Skalenteile 250 mm, Papiervorschub durch Schrittmotor vorwärts 20 mm/h bis 320 mm/min, vorwärts/rückwärts extern steuerbar.
x/y: Philips PM 8041 DIN A4 Einzelblatt, maximale Schreibgeschwindigkeit x: 60, y: 75 cm/s, maximale Beschleunigung x: 2100, y: 3800 cm/s.
Speicher: 2-Kanal-Spitzenwertspeicher Sp 3540 A (Hottinger-Baldwin, D-Darmstadt)
Anzeiger: 2 Digitalmultimeter Kontron DMM 3020 (Kontron, D-Eching) mit BCD-Ausgang, 2 Drucker Kontron DDP 5070.

3 Prüfung der physikalischen Eigenschaften der Tabletten

A. Die Gleichförmigkeit des Gewichts

20 Tabletten wurden zufällig ausgewählt, gewogen, hieraus wurden das Durchschnittsgewicht, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet.

B. Zerfallszeit

a) nicht überzogene und magensaftlöslich überzogene Tabletten
Die Zerfallszeit von 6 Tabletten wurde mit USP XX- Zerfallprüfgerät mit Scheibchen in demineralisiertem Wasser bei 37°C gemessen. Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient wurden ermittelt.

b) magensaftresistente Tabletten
Die Zerfallszeit wurde nach USP XX mit dem genannten Prüfgerät bestimmt. Als künstlicher Magensaft wurde 0,1N-HCl, als künstlicher Darmsaft Phosphatpuffer pH 6,8 verwendet.

C. Bruchfestigkeit

Mittels des Heberlein-Testers (Fliss, CH-Le Locle) wurde die Bruchfestigkeit von 10 Tabletten ermittelt, daraus wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient errechnet.

D. Abriebsfestigkeit

Hier wurde der Roche-Friabilator (Instituts-Werkstatt) benutzt; 20 Tabletten wurden bei 20 U/min. und 4 min. Prüfdauer eingesetzt.
Ihre Friabilität in % wurde berechnet.

4 Methoden der Keimzahlbestimmung und Identifizierung von Problemkeimen

Der 2. gemeinsame Bericht einer gemischten Arbeitsgruppe der F.I.P. (59) diente als Leitfaden für die Prüfmethoden. Zur Vermeidung von Sekundär- bzw. Cross-Contamination wurden alle Arbeiten wie Bemusterung, Probennahme, evtl. Mahlen des Sterilisiergutes unter Laminar-Flow-Bedingungen durchgeführt. Die Laminar-Flow-Box der Fa. GEAG war vor jeder Bestimmung mindestens eine halbe Stunde in Betrieb, und ihre Flächen wurden mit 70proz. Isopropanol desinfiziert. Alle Reagenzien, Nährmedien und Geräte wurden, soweit notwendig, durch geeignete Maßnahmen entkeimt. Die Nährmedien wurden, wenn es ihre Stabilität zuließ, vor ihrem Einsatz zur Sterilitätskontrolle eine geeignete Zeit vorbebrütet. In Iodzahlkolben mit Glaskugeln wurden erforderliche Suspensionen und Verdünnungen mit folgender Pufferlösung vorgenommen:

Rp.

KH_2PO_4	3,56 g
$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	7,23 g
NaCl	4,30 g
Pepton aus Casein	1,00 g
Aqua dest. ad	1000 ml

4.1 Bestimmung der Anzahl aerober Bakterien

1 g Probe wird in 10 ml Pepton-Phosphatpuffer homogen verteilt. 0,5 g dieser Stammlösung bzw. eine geeignete Verdünnung wird mit dem Spatel auf die Oberfläche der vorbereiteten Agarplatten (Caso-Agar-Merck, Art.Nr. 5458) gleich-

mäßig verteilt.
Die Auswertung erfolgt nach 3tägiger Bebrütung bei 30°C.

4.2 Bestimmung der Anzahl Hefen und Schimmelpilze

Je nach erwarteter Keimzahl werden 1 bzw. 5 ml der Stammsuspension in einer Petrischale mit dem auf ca. 45°C abgekühlten Sabouraud-Glucose 2% Agar (Merck, Art.nr. 7315) versetzt, gut durchgemischt und mind. 10 Tage bei Raumtemperatur bebrütet. Ist in dieser Zeit noch kein Wachstum festzustellen, wird die Brutzeit um weitere 10 Tage verlängert.

4.3 Nachweise von sogenannten Problemkeimen

Gegenüber dem 2.gemeinsamen Bericht der F.I.P. (59) wurde folgendes geändert: Anstelle von 10 ml des Homogenisates 10% wurde 1 g Untersuchungsmaterial direkt mit den jeweiligen Nährmedien versetzt.

4.4 Nachweis von Pseudomonas aeruginosa

Die Anreicherung wurde auf Cetrimid-Agar während 48 Std. bei 42°C bebrütet (124). Bei schwacher oder fehlender Farbstoffbildung wurde der Cytochromoxidase-Test (125) zur Bestätigung durchgeführt.

4.5 Nachweis von Salmonellen

10 ml der Voranreicherung wurden in Tetrathionat-Bouillon übertragen und 48 Std. bei 43°C bebrütet (126).

5 Lagerungstest

Pulverproben, unlackierte und lackierte Tabletten wurden in gut verschlossene Glasbehälter eingebracht und bei 37°C im Trockenschrank (Heraeus 5050, D-Hanau) gelagert.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Möglichkeiten zur Optimierung der Pankreasenzymtabletten gezeigt. Dies geschah durch Formulierung nicht magensaftresistenter und magensaftresistenter Tabletten mit rascher und vollständiger Wirkstofffreigabe und durch Reduzierung der Keimzahl von Pankreatin ohne wesentliche Enzymverluste. Zusätzlich wurden die Einflüsse von Gallensalzen, die häufig mit Pankreatinpräparaten zusammen verordnet werden oder kombiniert sind, auf die Lipaseaktivierung, -freigabe und -haltbarkeit sowie auf die Tabletteneigenschaften untersucht. Ebenso wurde nach den Ursachen für widersprüchliche Literaturangaben über Wirksamkeit und Haltbarkeit von Pankreasenzympräparaten gesucht. Es stellte sich aufgrund von Ergebnissen einer Untersuchung von Pankreatin unterschiedlicher Herstellungschargen resp. Hersteller heraus, daß das Pankreatin je nach Herkunft und Bearbeitungsweise sehr unterschiedliche Eigenschaften zeigt.

Für die Bestimmung der Lipase- und Amylase-Aktivität wurde die nephelometrische oder die F.I.P.-Methode eingesetzt. Die Tabletten wurden durch Direkttablettierung mittels geeigneter Hilfsstoffe hergestellt.

Erst Lager- und Freigabestudien erlauben eine vollständige Beurteilung der Eignung von Filmbildnern für Lackierung des Pankreatins. Unter den untersuchten Filmbildnern und Methoden erwies sich Lackieren mit HPMC als beste Methode für magensaftlösliche Pankreatin-Lacktabletten hinsichtlich Zerfall, Wirkstofffreigabe und Enzymstabilität bald nach Herstellung sowie nach Lagerung bei 37°C. Andere Lacke außer PEG verzögern die Enyzmfreigabe beträchtlich. Beim Lagern bei 37°C verlieren PEG und PVP lackierte Tabletten erheblich an Enzymaktivität, was sich bald nach der Herstellung noch nicht zeigt, da die Wechselwirkungen in Tabletten nur sehr langsam ablaufen.

Zur Reduzierung der Keimzahl von Pankreatin wurden physikalische und chemische Entkeimungsmethoden eingesetzt. Als ein auch umweltfreundliches Verfahren erwies sich Verminderung der Keimzahl allein durch die Preßkraft bei Tablettiervorgang für Pankreatin am geeignetsten. Unter bestimmten Bedingungen eignen sich sowohl Gammastrahlen als auch Ethylenoxid. Bekanntermaßen weisen beide Verfahren erhebliche Nachteile auf. Hingegen ist Isopropanol kein geeignetes Mittel.

Bei Lagerung von unbehandelten und behandelten Proben - mit allen genannten Entkeimungsverfahren - wird der negative Effekt mikrobieller Kontamination deutlich. Die Lipaseverluste bei den antimikrobiell unbehandelten Proben sind viel größer als bei den behandelten. Dies ist ein weiterer Grund, der zur Entkeimung von Pankreatin verpflichtet. Die Lagerstudie zeigte auch deutliche Unterschiede bei den Lipaseverlusten zwischen den nach verschiedenen Methoden behandelten Proben.

Bezüglich der Einflüsse der Gallensalze auf Pankreatin wurde gefunden, daß die Lipaseaktivierung von Typ und Konzentration der Gallensalze abhängt und mit der Adsorption des Enzyms an Oberflächen ebenso zusammenhängt wie mit Diffusion und Solubilisation der Fettsäuren. Die berechneten kinetischen Parameter zeigen an, daß die Lipaseadsorption an der Grenzfläche Öl/Wasser der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fettspaltung sein dürfte. Die mit Gallensalzen hergestellten Tabletten hatten schlechtere physikalische Eigenschaften und zeigten langsamere Lipasefreigabe. Gallensalze in der Prüfflüssigkeit fördern dagegen die Enzymfreisetzung. Beim Pressen waren die Lipaseverluste bei den Kombinationen mit Gallensalzen vernachlässigbar, wurden aber bei einjährigem Lagern bei 37°C signifikant. Die Verluste lagen bei Taurocholat, Cholat und Ochsengalle höher als bei Deoxycholat. Die Reaktionskinetik 1.Ordnung sowie die Weibull-Verteilungsfunktion entsprechen den Stabilitätsdaten, die Weibullfunktion jedoch besser.

Literaturverzeichnis

(1) Ehrhardt, L., Acta Pharm. Techn. Suppl. 1, 125 (1976).
(2) Grözinger, K.H., Volkwein, A. und Böhler, R., Arzneim.-Forsch. 22, 1152 (1972).
(3) Mülhens, K.J., Med. Klin. 66, 1123 (1971).
(4) Berndt, W., Müller-Wieland, K. und Staudt, U., Med. Klin. 65, 2281 (1970).
(5) Müller- Wieland, K. und Berndt, W., Dtsch. Med. Wochenschrift 94, 1870 (1969).
(6) Berndt, W. und Müller-Wieland, K., Ernährungsumschau 15, 304 (1968).
(7) Lechner, J.J und Heinkel, K., Z. Gastroenterologie 7, 323, (1969).
(8) Goebel, H. und Bode, C., Med. Welt 15, 877 (1969).
(9) Nada, A.: Dissertation Tübingen 1983.
(10) Grözinger, K.H., Volkwein, A. und Böhler, R., Med. Klin. 67, 458 (1972).
(11) Neubauer, H.P., Fülberth, W., Rupp, W. und Schleyerbach, R., Arzneim.-Forsch. 29, 1733 (1979).
(12) Hiestand, E., J. Pharm. Sci. 55, 1325 (1966).
(13) Stanelywood, N.G., Pharm. Ind. 40, 73, 170, 386 (1978).
(14) Carr, R.L., Chem. Eng. 76, 7 (1969).
(15) Ruyssen, R. und Lauwers A., "Pharmaceutical Enzymes", E. Story-Scientia, Gent, Belgien (1978).
(16) Graf, E., Sakr, A. und Nada, A., Pharm. Ind. 42, 1031 (1980).
(17) Graf, E., Ghanem, A. und Nada, A., ibid. 44, 317 (1982).
(18) Böhme, H. und Hartke, K., "Deutsches Arzneibuch", 7. Ausgabe Kommentar, Govi Verlag GmbH, Frankfurt (1968), S. 56.
(19) Bagster, D.F. und Crooks, M.J., Drug Dev. Ind. Pharm. 3, 475 (1977).
(20) Train, D., J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed. 49, 265 (1960).
(21) Arambulo, A. A., Fu, H.S. und Deardoff, D.L., ibid. 42, 692 (1953).
(22) Hammouda, Y., El-Banna, H.M. und Eshra, A.G., Pharm. Ind. 37, 361 (1975).

(23) Ridgway, K. und Rupp, R., J. Pharm. Pharmacol. 21, 305 (1969).
(24) Armstrong, N.A. und Griffiths, R.V., Pharm. Acta Helv. 45, 692 (1970).
(25) Lazarus, J. und Lachman, L., J. Pharm. Sci. 55, 1121 (1966).
(26) Jones, T.M., J. Soc. Cosmet. Chem. 21, 483 (1970).
(27) Fell, J. T., Pharm. Weekbl. 111, 681 (1976).
(28) Craik, D. und Miller, B.F., J. Pharm. Sci. 59, 530 (1970).
(29) Graf, E. und Sakr, A., Pharm. Ind. 41, 86 (1979).
(30) Pietra, V. und Setnikar, I., J. Pharm. Sci. 59, 530 (1970).
(31) Bolhuis, G.K. und Lerk, C. F., Pharm. Weekbl. 108, 469 (1973).
(32) Augsburger, L. und Shangraw, R.F., J. Pharm. Sci. 55, 418 (1966).
(33) Toth, Z., Bako, A.v., Toncsev, H., Csiba, A. und Rona, K., Gyogyszereszet 20, 168 (1976).
(34) Hüttenrauch, R. und Keiner, I., Pharmazie 31, 654 (1976).
(35) Ehrhardt, L., Acta Pharm. Technol. 22, 125 (1976).
(36) Bauer, C.W. und Vazakas, A.J., J. Am.Pharm. Assoc. Sci. Ed. 40, 552 (1951).
(37) Jacob, J.T., Nessel, R.J. und Blodinger, T., J. Pharm. Sci. 57, 1854 (1968).
(38) Holl, W.W., Micheals, T.P. und Sinotte, L.P., J. Pharm. Sci. 52, 817 (1963).
(39) Ahsan, S.S. und Blang, S.M., Drug Stand. 26, 29 (1958).
(40) Alam, A.S. und Parrot, E.L., J. Pharm. Sci. 61, 265 (1972).
(41) Borgström, B. und Donner, J., J. Lipid Res. 17, 491 (1976).
(42) Cordes, G. und Ebbinghaus, U., Therapiewoche 23, 3120 (1973).
(43) Graham, D.Y., Engl, N., J. Med. 296, 1314 (1977).
(44) Möller, H., Pharm. Ztg. 125, 2252 (1980).
(45) Nakai, Y., Nakajima, S. und Kakizawa, H., Chem. Pharm. Bull. 22, 2910 (1974).
(46) Schwartz, J.B. und Alvino, T.P., J. Pharm. Sci. 65, 572 (1976).
(47) Pickard, J.F., Elworthy, P.H. und Sucker, H., J. Pharm. Pharmacol. 28, 20 P (1976).
(48) Coletta, V. und Rubin, J., J. Pharm. Sci. 53, 953 (1964).

(49) Graf, E., Ghanem, A.H. und Fawzy, A.A., Pharm. Ind. 44, 1177 (1982).

(50) Graf, E., Sakr, A. und Nada, A., Pharm. Ind. 43, 282 (1981).

(51) Kallings, L.O, "Contamination in the manufacture of pharmaceutical products" ed. by Secretatiat of the European Trade Association, S. 17, 1973.

(52) Wallhäußer, K.H., Pharm. Ind. 39, 491 (1979).

(53) Graf, E. und Scheer, R., ibid. 42, 732 (1980).

(54) Bloomfield, F.S., Mounajed, R. und Nixon, R.J., Acta Pharm. Technol. 25, 189 (1979).

(55) Lüssi-Schlatter, B. und Speiser, P., Pharm. Acta Helv. 49, 41 (1974).

(56) Lüssi-Schlatter, B., Solvia, M. und Speiser, P., ibid. 49, 66 (1974).

(57) Speiser, P., Acta Pharm. Technol., Supp. I, 81 (1975).

(58) Fiebre, W.C., Burck, T.K. und Feldmann, D., Appl. Microbiol. 17, 344 (1969).

(59) 2. Gemeinsamer Bericht des Komitees der offiziellen Laboratorien und Dienststellen zur Kontrolle von Medikamenten und der Sektion der Industrie-Apotheker FIP, Pharm. Acta Helv. 51, 41 (1976).

(60) Bridges, S.A., Prog. Ind. Microbiol. 5, 283 (1964).

(61) Morimoto, K., Kimura, S., Inamore, Y. und Morisaka, K., Chem. Pharm. Bull. 28, 1304 (1980).

(62) Mayer, A., in Ullmanns Encyklopadie der Technischen Chemie, 3. Auflage, Bd. 7, S. 396, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin 1956.

(63) Kawashima, K., Naugo,Y., Doi, T. und Umeda,K., J. of Food Ind. of Japan 20, 9 (1973).

(64) ibid. 21, 15 (1974).

(65) Powell, P.D. und Bridges, A.B., Research 13, 151 (1960).

(66) Wallhäußer, K.H., Pharm. Ind. 32, 247 (1970).

(67) Böhme, H. und Hartke, K. "Deutsches Arzneibuch", 8. Ausgabe, Kommentar, S. 937, Wissenschaftl. Verlagsges. mbH, Stuttgart 1978.

(68) Jacobs, P.G., Pharm. Acta Helv. 52, 302 (1977).
(69) Meno, T., Yoshida, F., Nishimura, A. und Kotaka, T., Ann. Rep. Rad. Center, Osaka 16, 62 (1975).
(70) Sakai, T., Yoshida, Y., Demura, H., Yanogila, T., Meiwa, M. und Ohyama, K., Chem. Pharm. Bull. 26, 1130 (1978).
(71) Hornish, E.R., J. Chromat. 236, 481 (1982).
(72) Jacobs, P.G. und Melumed, D., Pharm. Acta Helv. 51, 313 (1976).
(73) Holland, J., Antoni, F., Galatzeanu, L., Schulman, M., Kazinet, G., "Radiosterilization of medical Products", I.A.E.A., Wien, S. 69, 1967.
(74) Hromadova, M., Macho, L., Strobak, V., Vigas, M. und Mikulaj, L., Endocrinologia Experimentalis 13, 115 (1979).
(75) Wallhäußer, K.H., "Sterilisation, Desinfektion, Konservierung", 2. Auflage, S. 262, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1978.
(76) Hinweis in Pharm. Ztg. 128, 700 (1978).
(77) Roxan, J.J, Austr. J. Pharm. Sci. N52, 65 (1973).
(78) Phillips, C.R. und Kaye, S., Am. J. Hyg. 50, 270 (1949).
(79) Wallnöfer, B., Hyg. Med. 4, 69 (1979).
(80) Adam, W. und Mary, G., Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. orig. B. 171 538 (1980).
(81) Willson, J.E., Bull. of Parenteral Drug Assoc. 24, 226 (1970).
(82) Laureut, C., Frederic, J. und Marechal, F., C.R. Seances Soc. Biol. Ses. Fil. 176, 733 (1982).
(83) Horikoshi, J., Tackeguchi, N. und Morii, M., Chem. Pharm. Bull. 21, 2136 (1973).
(84) Graf, E., Ghanem, A.H. und Fawzy, A.A., Pharm. Ind. 45, 295 (1983).
(85) ibid. im Druck
(86) Graf, E., Ghanem, A.H. und Nada, A., ibid. 45, 81 (1983).
(87) Yamazaki, K., Yokoyama, H., Nanoura, Y., Umezawa, C. und Kawasaki, C., Chem. Pharm. Bull. 29, 2966 (1981).
(88) Mattson, F.H., Volpenhein, A.R. und Benjamin, L., J. Biolog. Chem. 245, 5335 (1970).
(89) Sobotka, H., "Physiological Chemistry of Biles", Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md., 1937.
(90) Lelcer, I. und Lazo-Wasem, E.A., J. Pharm. Sci. 53, 680 (1964).

(91) Verger, R., De Haas, G.H., Sarda, L. und Desnuelle, P., Biochim. Biophys. Acta 188, 272 (1969).
(92) Wills, E.D., Biochem. J. 60, 529 (1955).
(93) Hallewood, G.A.D., Physiol. Rev. 35, 178 (1955).
(94) Ogiso, T. und Sugiura, M., Chem. Pharm. Bull. 17, 1034 (1969).
(95) De Moerloose, P., Pure Appl. Chem. 3, 433 (1961).
(96) Brockerhoff, B., J. Biol. Chem. 246, 5828 (1971).
(97) Borgström, B. und Frlanson, C., Eur. J. Biochem. 37, 60 (1973).
(98) Morrsen, W.E. und Brockman, H.I., J. Biol. Chem. 254, 378 (1976).
(99) Lairon, D., Augeire, M.C., Nalbone, G., Leonardi, J., Hauton, J.C., Pieroni, G., Ferrato, F. und Verger, R., Biochim. Biophys. Acta 618, 106 (1980).
(100) Lairon, D., Nalbone, G., Lafont, H., Leonardi, J., Vigne, J.L., Chabert, C., Hauton, J.C. und Verger, R., ibid. 618 119 (1980).
(101) Benzonana, G. und Desnuelle, P., ibid. 164, 47 (1968).
(102) Herndon, W.C., J. Chem. Education 44, 724 (1967).
(103) Brockerhoff, H. und Jensen, R.G., "Lipolytic Enzymes", Academic Press, New York, N.Y., 1974, S.15.
(104) Dixon, M., Webb, E.C., "Enzymes", Longmans, London 1964, S.63.
(105) Ashworth R.N.,und Heard,D.D.,J. Pharm. Pharmacol. 18, 985 ((1966).
(106) Carstensen, J.T., Wright, J.L., Blessel, K. und Sheridan, J., J. Pharm. Sci. 67, 1303 (1978).
(107) ibid. 66, 607 (1977).
(108) ibid. 67, 48 , 982 /1978).
(109) Gibaldi, M., Feldman, S., J. Pharm. Sci. 59, 579 (1970).
(110) Graf, E., Ghanem, A.H., Sakr, A. und Mahmoud, H., Pharm. Ind. 43, 576 (1981).
(111) Wagner, J.G., J. Pharm. Sci. 58, 1253(1969).
(112) Taraszka, M.J. und Delor, R.A., ibid. 58, 207 (1969).
(113) Langenbucher, F., J. Pharm. Pharmacol. 24, 979 (1972).
(114) Kitazawa, S., Johno, I., Ito, Y., Teramura, S. und Okada, ibid. 27, 765 (1975).

(115) Kitazawa, S., Johno, I., Minouchi, T. und Okada, J., ibid. 29, 453 (1977).
(116) Gibaldi, M. und Feldman, S., J. Pharm. Sci. 56, 1238 (1967).
(117) Graf, E., Ghanem, A.H. und Mahmoud, H., Pharm. Ind. 46, 279 (1984).
(118) Graf, E., Ghanem, A.H. und Nada, A., ibid. 45, 295 (1983).
(119) Zinterhofer, L., Wardlaw, S., Jatlow, P. und Seligson, D., Clin. Chem. Acta 43, 5 (1973).
(120) Somogyi, M., J. Biol. Chem. 125, 399 (1938).
(121) Hennrich, N., Pharm. Ind. 31, 228 (1969).
(122) Zinterhofer, L., Wardlaw, S., Jatlow, P. und Seligson, D., Clin. Chem. Acta 44, 173 (1973).
(123) Cherry, I.S. und Crandell, J., Am. J. Physiol. 100, 266 (1932).
(124) Mikrobiologisches Handbuch, E. Merck, Darmstadt (1977), S.99.
(125) (124) S.9.

Verwendete Abkürzungen und Handelsnamen

F.I.P.	Fédération Internationale Pharmaceutique
V.K.	Variationskoeffizient
r	Korrelationskoeffizient
VBF	Verhältnis Bruchfestigkeit/Friabilität
Avicel^{R}	Mikrokristalline Cellulose
CLPVP	Polyplasdone XL: quervernetztes Polyvinylpyrrolidon
HPMC	Viscostran 50: Hydroxypropylmethylcellulose
PVP	Kollidon 25: Polyvinylpyrrolidon
PEG	Polyethylenglykol
EE	Eudragit E (ein kationisches Polymerisat aus Dimethylaminoethylmethacrylat und anderen neutralen Methacrylsäureestern)
EL	Eudragit L (ein anionisches Polymerisat aus Methacrylsäure und Methacrylsäuremethylester)
CAP	Celluloseacetatphthalat

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. E. Graf Herrn Prof. Dr. A.A. Kassem, Dr. H.H. El Shattawy und Dr. A. Kassem waren die Professoren und Dozenten:

E. Nour Eldin, S. Zaki, A. Abdel Bari, A. El-Assas, A. Badawi, M. El-Samligi, A. Shawki (Pharmazeutische Technologie)

G. Mahran, M. Karawia, S. Hilal, S. Abdelwahab, A. Zaki, F. Hashim und A. Elshamy (Pharmazeutische Biologie)

M. Amer, A. Ahmed, A. Abou Elkhair, H. Abou-Shady, Y. Dessoukey, M. Ebid (Analytische und Pharmazeutische Chemie)

A. El-Masri, M. Khayal, S. Saleh, A. Kheir El-Din. (Pharmakologie und Biochemie)

O. El-Tayeb (Mikrobiologie).

Lebenslauf

18. Januar 1951	geboren in Kairo, Ägypten
1957. - 1969	Grundschule und Gymnasium (preparatory and secondary school) in Kairo
ab Oktober 1969	Pharmaziestudium an der Universität Kairo
Mai 1974	Pharmazieabschlußprüfung in Kairo (Bachelor of Pharmacy)
Okt.1974-Okt.1975	In der pharmazeutischen Industrie bei der staatlichen Firma El-Kahra for drugs and chemical products, Kairo
Nov. 1975- Juni 1976	Assistent an der Fakultät für Pharmazie der Universität Assiut/Ägypten
Juli 1976	Assistent an der Fakultät für Pharmazie der Universität Zagazig/Ägypten
Oktober 1976	Beginn der Magisterarbeit an der Fakultät für Pharmazie der Universität El-Azhar/Kairo, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. A.A. Kassem mit dem Titel "A contribution to direct compression of tablets"
29. Mai 1979	Magistergrad in Pharmazie (Master of pharmaceutical sciences, pharmaceutical technology)
ab Juli 1979	Assistant Lektor an der Fakultät für Pharmazie der Universität Zagazig/Ägypten
April 1980	Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes
21.April-30.Sept.1980	Deutscher Sprachkurs am Goethe-Institut Rothenburg o.T.
Oktober 1980- Mai 1984	Anfertigung der vorliegenden Arbeit